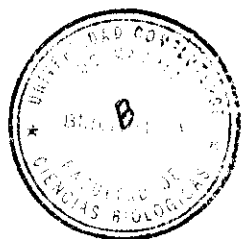
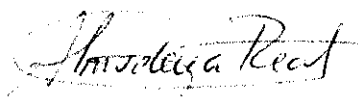


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA

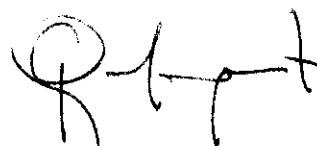
**RADIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR POLISACÁRIDOS  
IÓNICOS EN RATÓN. RELACIÓN CON SU CAPACIDAD PARA  
ESTIMULAR EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO**



Vº Bº Directores de la Tesis

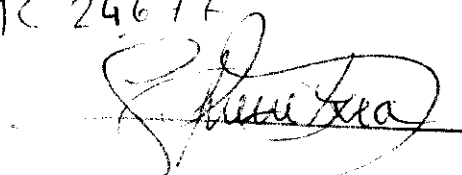


Almudena Real Gallego



Gabriel Maganto Fernández

R. 24617



Guillermo Güenechea Amurrio

TESIS DOCTORAL

1995

***A ama y aita***

Este trabajo de investigación ha sido realizado en la U. de Biología Molecular y Celular del Instituto de Medio Ambiente del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección de la Dra. Almudena Real Gallego y el Dr. Gabriel Maganto Fernández.

## AGRADECIMIENTOS

Una de las mejores cosas que me han pasado en mi vida ha sido el venir a Madrid a realizar mi tesis doctoral en el CIEMAT. Ahora, tengo la oportunidad de agradecer a todas las personas, que de una manera u otra, han hecho posible que este trabajo haya podido realizarse y plasmarse en esta memoria. Quiero hacer una mención especial a mis directores de tesis, Almudena y Gabriel, que desde distintas perspectivas me han apoyado de una forma incondicional, supervisando y ayudándome en todos los momentos de la realización de esta tesis.

Al CIEMAT, por concederme una beca de investigación y aportar todos los medios técnicos y humanos de que dispone.

Al Dr. **Francisco Mingot**, director de Control de Operaciones del CIEMAT y ex-director del Instituto de Medio Ambiente, por facilitarme el llevar a cabo esta tesis.

Al Dr. **Gabriel Maganto**, codirector de esta tesis y actual director del Instituto de Medio Ambiente, cuyo ejemplo y confianza depositada en mí han sido fundamentales en mi formación.

Al Dr. **Juan Bueren**, Jefe de la U. de Biología Celular, por sus sugerencias científicas, paciencia y disposición desde que inicié este trabajo.

Al Dr. **Jose Luis Jorcano**, Jefe de la U. de Biología Molecular y Celular, por todo lo que supone ser mi jefe de Unidad.

A la Dra. **Almudena Real**, codirectora de esta tesis y gran compañera, por sus enseñanzas que han ido más allá de lo profesional y cuya dedicación y estímulo constantes han sido de inestimable valor en la realización de esta tesis.

A la Dra. **Beatriz Albella**, gran compañera de trabajo, cuya amistad, entusiasmo y disposición han sido de gran ayuda en todo momento.

A **Carmelo Esteban**, cuya experiencia profesional y disciplina han sido esenciales en los quehaceres del laboratorio y sobretodo, con el manejo del equipo de rayos-X.

A **Elena**, experta radiactiva, por su buen hacer, amistad y empeño en crear un ambiente inmejorable en el laboratorio.

A **Solealf**, excelente fotógrafa, por todas las fotos de autorradiografías realizadas y sobretodo por tantos buenos momentos.

A **M<sup>a</sup> José y Ana**, por su eficaz ayuda y amistad, aunque ya no están en el labo, seguimos compartiendo sabrosos momentos.

A **Jesús** y resto de personal del animalario, **Eva** y **Rosa**, cuyo cuidado exhaustivo de los ratones ha sido crucial en la experimentación realizada en esta tesis.

A **Israel**, **Campos**, **Sergio** y **Montse**, ya que su apoyo, amistad y buen humor me han animado en todo el proceso.

A todos mis compañeros-as del laboratorio de hematopoyesis, **Jose Carlos**, **Teresa**, **Florencio** y **Antonio**, de todos he aprendido muchas cosas, gracias por vuestra ayuda y ánimos.

Al grupo de **Pepe**: **Txusma**, **Lele** y **Juan Carlos**, con ellos me inicié en el mundo de la biología molecular.

Al resto de compañeros-as del laboratorio del "fondo", por su contribución en múltiples aspectos, **Pilar**, **Carmen**, **Angustias**, **Isabel**, **Cristina**, **Fernando**, **Mirentxu**, **Llanos**, **Manuel**, **Rodolfo**, **Jesús**, **Ángel**.

A todos los que pasaron por el laboratorio, entre otros-as: **Javierinchi**, **Madame**, **Juanillo**, **Jose**, **Elvira**.

A Antibióticos Pharmacia S.A., por las sondas cedidas y sugerencias en el campo de la biología molecular, en especial a **Emilia**.

Finalmente, quiero hacer un agradecimiento especial a Industrial Farmacéutica Cantabria S.A. por su apoyo y facilidades concedidas en todo momento, y en especial al Dr. **Juan Pablo Pivel**, Dr. **Antonio Guerrero** y **Pilar Tuduri**, por su colaboración y revisión del manuscrito.

Y por último, a todas las personas que desde fuera me han animado y aguantado en los momentos difíciles. A **Luis**, **Manuel**, **Sandra**, **Vero**, **Albe**, **Cris**, **Piru**, **María**, allegados y demás amigos-as. Desde el Norte, a **Ana**, **Upe**, **Txaro**, **Ramón**, **Alberto**, **Fernando**, **Pedro** y **Txomin**. A toda mi familia, especialmente a mis padres, hermano-as y sobrinos-as.

## ÍNDICE

<b>1.- <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.- SISTEMA HEMATOPOYÉTICO</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Organización del sistema hematopoyético .....	2
1.1.1.1. Compartimento de precursores pluripotentes .....	3
1.1.1.2. Compartimento de precursores comprometidos .....	7
1.1.1.3. Compartimento de células maduras y en proceso de maduración .....	9
1.1.2. Regulación del sistema hematopoyético .....	11
1.1.2.1. Regulación humoral de la hematopoyesis .....	12
1.1.2.2. Regulación celular de la hematopoyesis: estroma hematopoyético .....	19
<b>1.2.- EFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO</b> .....	<b>22</b>
1.2.1. Daño hematopoyético radioinducido .....	23
1.2.1.1. Radiosensibilidad de células hematopoyéticas .....	23
1.2.1.2. Radiosensibilidad del tejido hematopoyético: síndrome de la médula ósea .....	25
1.2.2. Recuperación hematopoyética espontánea después de una irradiación .....	25
1.2.3. Moléculas con capacidad para favorecer la recuperación hematopoyética después de una irradiación .....	27
1.2.3.1. Factores hematopoyéticos .....	28
1.2.3.2. Polisacáridos y compuestos asociados .....	31
<b>2.- <u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b>35</b>
<b>3.- <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.- POLISACÁRIDOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.- MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	<b>39</b>
3.2.1. Animales de experimentación .....	39
3.2.2. Suspensiones celulares de órganos hematopoyéticos .....	39
3.2.2.1. Suspensión celular de médula ósea .....	40
3.2.2.2. Suspensión celular de bazo .....	40
3.2.2.3. Extracción de sangre periférica. Obtención de suero .....	40
3.2.3. Líneas celulares establecidas .....	40

<b>3.3.- CUANTIFICACIÓN DE PRECURSORES Y CÉLULAS</b>	
<b>MADURAS HEMATOPOYÉTICAS</b> .....	42
3.3.1. Ensayo de precursores hematopoyéticos pluripotentes .....	42
3.3.2. Ensayo de precursores hematopoyéticos comprometidos .....	43
3.3.2.1. Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas (CFU-GM) .....	43
3.3.2.2. Unidad formadora de <i>burst</i> eritroides (BFU-E) .....	44
3.3.3. Cuantificación de células maduras en sangre periférica .....	46
<b>3.4.- CULTIVO DE LARGA DURACIÓN DE MÉDULA ÓSEA (LTBMC) .....</b>	46
<b>3.5.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE</b>	
<b>FACTORES HEMATOPOYÉTICOS</b> .....	48
3.5.1. Determinación de la presencia de actividad estimuladora de colonias	
CFU-GM (GM-CSA) .....	48
3.5.2. Análisis de la expresión de factores hematopoyéticos .....	49
3.5.2.1. Sondas de ADN para factores hematopoyéticos .....	49
3.5.2.2. <i>Northern blot</i> .....	50
3.5.3. Inmunoensayo enzimático, ELISA .....	52
<b>3.6.- IRRADIACIÓN</b> .....	53
<b>3.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	54
<b>4.- <u>RESULTADOS</u></b> .....	55
<b>4.1.- CAPACIDAD DE LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y</b>	
<b>AM251 PARA ESTIMULAR Y/O RADIOPROTEGER EL SISTEMA</b>	
<b>HEMATOPOYÉTICO DE RATÓN</b> .....	56
4.1.1. Efecto de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre la	
hematopoyesis de ratones normales .....	57
4.1.2. Actividad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre la	
hematopoyesis <i>in vitro</i> , en cultivos de larga duración de médula	
ósea de ratón (LTBMCs) .....	61
4.1.3. Análisis de la capacidad radioprotectora de los polisacáridos AM218,	
AM250 y AM251 en animales con síndrome hematopoyético provocado	
por radiación .....	64



4.1.3.1. Radioprotección conferida por los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 en ratones irradiados con dosis potencialmente letales .....	65
4.1.3.1.a. <i>Influencia de la dosis de polisacárido administrada sobre su efecto radioprotector</i> .....	65
4.1.3.1.b. <i>Influencia de la pauta de administración en la radioprotección conferida por los polisacáridos</i> .....	68
4.1.3.1.c. <i>Determinación del factor de reducción de dosis (DRF)</i> .....	72
4.1.3.2. Efecto de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre la hematopoyesis de ratones irradiados con una dosis subletal .....	74
<b>4.2.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251 SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE RATÓN</b> .....	77
4.2.1. Mecanismos implicados en la radioprotección conferida por los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 .....	77
4.2.1.1. Capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para favorecer la recuperación hematopoyética en ratones irradiados con dosis potencialmente letales .....	77
4.2.1.2. Influencia del tratamiento con el polisacárido AM218 sobre la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos .....	82
4.2.2. Mediadores implicados en los efectos asociados a los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre el sistema hematopoyético .....	88
4.2.2.1. Capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para inducir la producción y expresión de factores hematopoyéticos en el LT BMC .....	88
4.2.2.1.a. <i>Producción de factores hematopoyéticos en el sobrenadante de LT BMCs</i> .....	89
4.2.2.1.b. <i>Niveles de expresión de factores hematopoyéticos en la capa adherente de LT BMCs</i> .....	91
4.2.2.2. Capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para inducir la expresión y producción de factores hematopoyéticos <i>in vivo</i> .....	94
4.2.2.2.a. <i>Niveles de expresión de factores hematopoyéticos en la médula ósea y el bazo</i> .....	95
4.2.2.2.b. <i>Niveles de factores hematopoyéticos en el suero</i> .....	97
<b>5.- <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	99
<b>5.1.- ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE RATONES NORMALES INDUCIDA POR LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251</b> .....	101

<b>5.2.- RADIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251 .....</b>	<b>104</b>
<b>5.3.- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RADIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251 .....</b>	<b>108</b>
<b>5.3.1. Los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 son estimuladores de la recuperación hematopoyética en ratones con síndrome de la médula ósea ...</b>	<b>109</b>
<b>5.3.2. El polisacárido AM218 actúa disminuyendo la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos .....</b>	<b>112</b>
<b>5.4.- INDUCCIÓN DE FACTORES HEMATOPOYÉTICOS TRAS EL TRATAMIENTO CON LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251. PAPEL MEDIADOR EN LA ACTIVIDAD DE ESTOS POLISACÁRIDOS SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO .....</b>	<b>114</b>
<b>6.- <u>CONCLUSIONES</u> .....</b>	<b>122</b>
<b>7.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....</b>	<b>125</b>

## **RESUMEN**

El daño inducido sobre el sistema hematopoyético es la principal causa de muerte tras la exposición a dosis moderadas de radiación, bien como consecuencia de accidentes radiológicos o de tratamientos de radioterapia. En ambas situaciones, es indiscutible la importancia de compuestos con capacidad para proteger y/o estimular el sistema hematopoyético.

En este contexto, y dentro de la línea de investigación para la selección de modificadores de la respuesta biológica con actividad estimuladora sobre el sistema hematopoyético, en la que colaboran la Unidad de Biología Molecular y Celular del CIEMAT e Industrial Farmacéutica Cantabria S.A., se han llevado a cabo los trabajos que configuran esta tesis.

En esta memoria, nos hemos centrado en el análisis de la capacidad de tres polisacáridos iónicos, AM218, AM250 y AM251, para estimular la hematopoyesis murina tanto en condiciones normales como en casos de exposición a radiación y confirmar así su potencial aplicación como terapia de apoyo en tratamientos mielosupresores.

Inicialmente, se determinó el efecto de dichos polisacáridos sobre el sistema hematopoyético no dañado, utilizando tanto un modelo *in vivo* de ratones normales, como un sistema *in vitro*, el cultivo de larga duración de médula ósea. Los resultados demostraron que el tratamiento con los polisacáridos estimula la hematopoyesis esplénica y medular, si bien en la médula ósea dicha estimulación sólo se pone de manifiesto *in vitro*.

Los tres polisacáridos mostraron una elevada capacidad radioprotectora cuando eran administrados antes de una irradiación potencialmente letal, mientras que no se observó efecto cuando el tratamiento se llevó a cabo después de la irradiación.

Los trabajos realizados para profundizar en los mecanismos de radioprotección de los polisacáridos objeto de estudio han puesto de manifiesto una relación entre la capacidad radioprotectora de éstos y su actividad estimuladora sobre el sistema hematopoyético. Así, en ratones sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, el tratamiento con los polisacáridos acortó el período de pancitopenia, crítico para la supervivencia del animal. En situaciones de daño moderado con dosis subletales de radiación, los polisacáridos también mostraron efecto estimulador sobre la hematopoyesis. Asimismo, el tratamiento con el polisacárido AM218 disminuyó la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos, aminorando el daño radioinducido.

Por último y dado el importante papel desempeñado por los factores hematopoyéticos no sólo en la regulación del sistema, sino también en procesos de radioprotección, se estudió la participación de estos factores en los distintos efectos asociados a los polisacáridos. Los estudios realizados pusieron de manifiesto que los polisacáridos promueven la síntesis de factores hematopoyéticos, a través de los cuales ejercerían su acción sobre el sistema hematopoyético.

## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>BFU-E</b>	Unidad formadora de <i>burst</i> eritroides.
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina.
<b>CFU-GM</b>	Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas.
<b>CFU-S</b>	Unidad formadora de colonias exógenas en bazo.
<b>Ci</b>	Curios.
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto.
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
<b>DRF</b>	Factor de reducción de dosis.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra-acético.
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo enzimático.
<b>Epo</b>	Eritropoyetina.
<b>EU</b>	Unidades de endotoxina.
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino.
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos.
<b>GM-CSA</b>	Actividad estimuladora de colonias granulo-macrofágicas.
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulo-macrofágicas.
<b>Gy</b>	Unidad internacional de dosis de radiación absorbida (Gray).
<b>ILs</b>	Interleuquinas.
<b>IMDM</b>	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Iscove.
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal.
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>LD</b>	Dosis letal.
<b>LTBMC</b>	Cultivo de larga duración de médula ósea.
<b>M-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de macrófagos.
<b>MOPS</b>	Morfolin propano sulfónico.
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>s.c.</b>	Subcutáneo.
<b>SCF</b>	<i>Stem cell factor</i> .
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico.
<b>SSC</b>	Solución salina estándar de citrato.
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil aminometano.
<b>v/v</b>	Relación volumen/volumen.

## **INTRODUCCIÓN**

## 1.1. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

El sistema hematopoyético está encargado de producir de una forma regulada todos los tipos celulares linfoides y mieloides presentes en el torrente sanguíneo y en otros tejidos corporales de los mamíferos.

Durante el desarrollo embrionario, la hematopoyesis tiene lugar en el hígado fetal mientras que en el adulto se localiza fundamentalmente en la médula ósea (Metcalf y Moore, 1971). En ratón, el bazo tiene una capacidad hematopoyética elevada en momentos de fuerte demanda de células sanguíneas, mientras que en condiciones normales actúa como apoyo de la médula ósea.

### 1.1.1. Organización del sistema hematopoyético

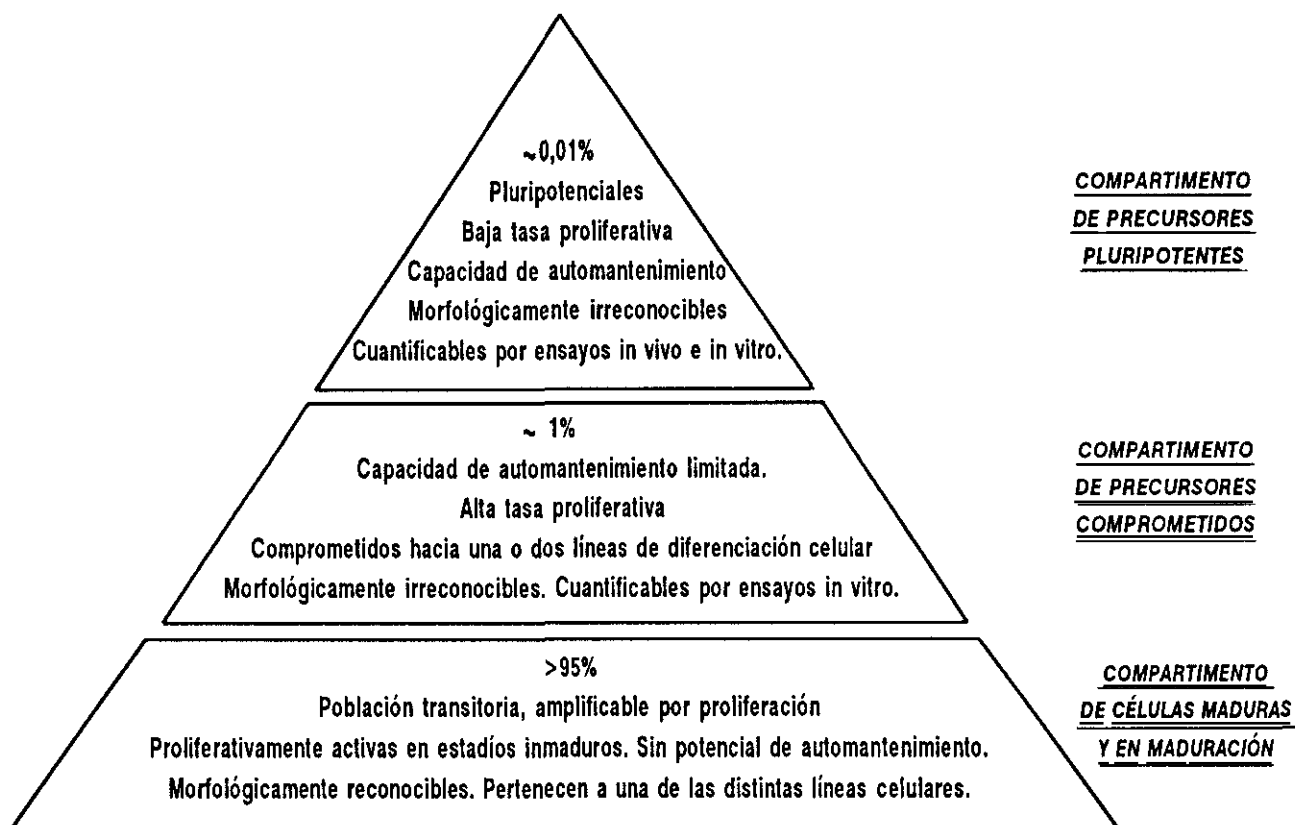
En el sistema hematopoyético, que constituye uno de los ejemplos más característicos de tejidos con organización jerárquica, se producen de forma continua células maduras funcionales a partir de una población relativamente pequeña de células madre o *stem* (un 0,01 % del total de la médula ósea), que por sucesivos eventos de proliferación, diferenciación y maduración, generan poblaciones amplificadas de precursores comprometidos, que a su vez se amplifican para dar lugar a los distintos tipos de células maduras funcionales (Lord y Testa, 1988) (figura 1).

La capacidad de automantenimiento de las células madre permite que se mantengan durante toda la vida del individuo, mientras que el compromiso hacia diferenciación tendrá como resultado la formación de todas las células maduras funcionales necesarias en sangre y tejidos. En general, se acepta que las células madre son una población celular que se encuentra mayoritariamente en estado quiescente, con un gran potencial proliferativo (Lajtha y col., 1969; Hodgson y Bradley, 1984; Lemischka y col., 1986). Sin embargo, a medida que las células madre van diferenciándose hacia una línea celular concreta adquieren una mayor tasa proliferativa, perdiendo su capacidad de automantenimiento (Till y McCulloch, 1980; Eaves y Eaves, 1984).

Los precursores de las distintas líneas de diferenciación hematopoyética no son morfológicamente reconocibles y se han podido caracterizar gracias a la puesta a punto de técnicas de cultivo *in vivo* e *in vitro*, lo que ha llevado a denominar a los distintos precursores en la mayoría de los casos con las siglas CFU (unidad formadora de colonias) seguido del término que especifica el tipo de colonia que va a dar lugar dicho precursor. Así, la CFU-GM correspondería al precursor de la línea granulo-macrofágica.



El sistema hematopoyético se ha estructurado clásicamente en tres compartimentos celulares (figura 1): compartimento de precursores pluripotentes, compartimento de precursores comprometidos y compartimento de células maduras y en proceso de maduración.



**Figura 1:** Esquema simplificado de la organización jerárquica del sistema hematopoyético.

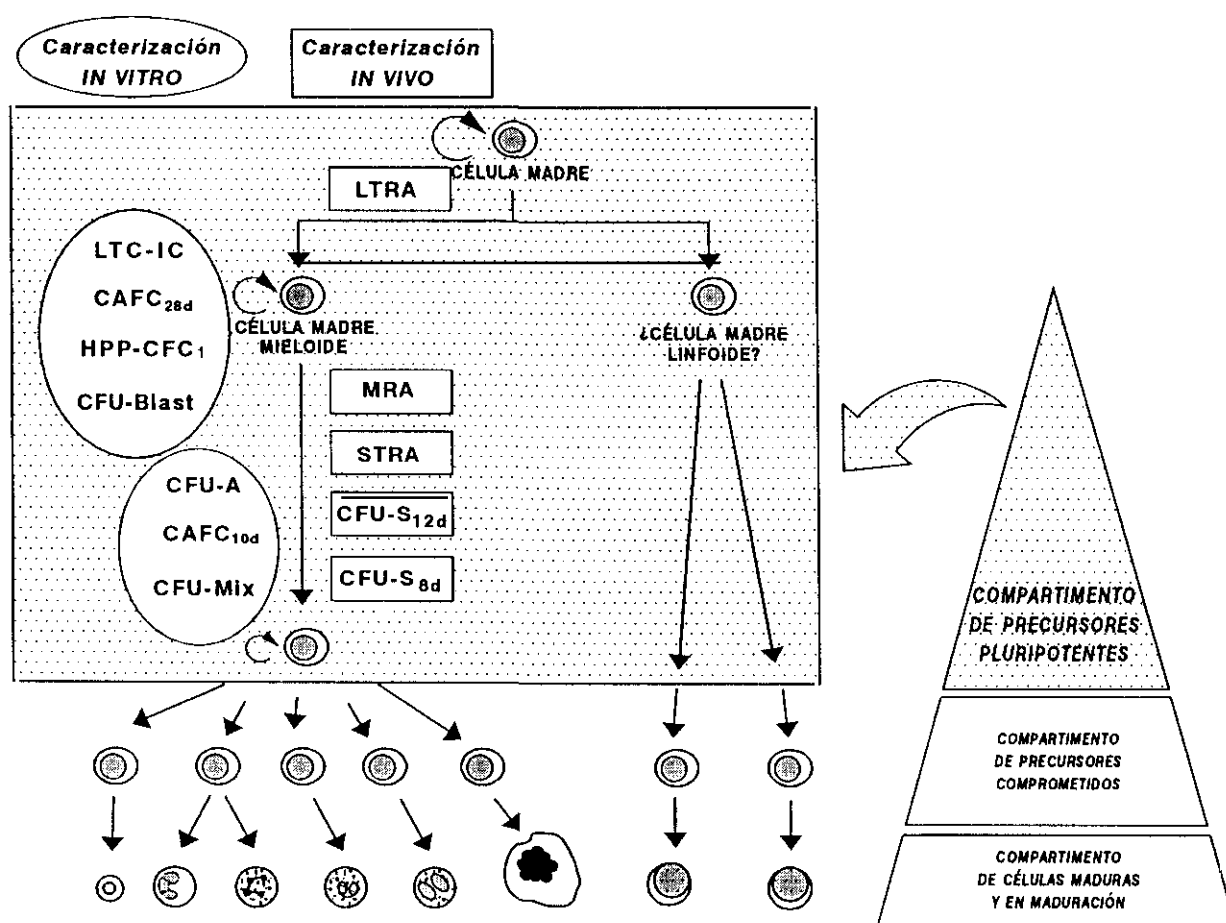
#### 1.1.1.1. Compartimento de precursores pluripotentes

Una célula perteneciente al compartimento pluripotente debería cumplir tres requisitos: gran potencial proliferativo, elevada capacidad de automantenimiento y pluripotencialidad (Lajtha y col., 1969) (figura 1).

Aunque en un principio se pensaba en el compartimento pluripotente como en una población relativamente homogénea, hoy en día se sabe que está compuesto por una gran diversidad de tipos celulares, los cuales muestran la mayoría, aunque no necesariamente la totalidad de las propiedades arriba mencionadas (Wright y Pragnell, 1992).

Para abordar el estudio de las distintas células del compartimento pluripotente, se han descrito una gran variedad de ensayos *in vivo* e *in vitro*, que incluyen tanto ensayos clonogénicos como diversas aproximaciones indirectas que permiten acercarse más a la caracterización de la verdadera célula madre (Watt y Visser, 1992; Lord, 1993) (figura 2).

A pesar de que el desarrollo de estas técnicas ha permitido caracterizar distintos representantes del compartimento pluripotente, sigue existiendo en la actualidad cierta incertidumbre en relación a la organización global de este compartimento. Ésto se debe principalmente al hecho de que en los últimos años, en base a una gran diversidad de condiciones de cultivo, se han definido un número elevado de precursores pluripotentes, lo que inevitablemente ha provocado que exista un solapamiento entre las características de los precursores descritos, haciendo muchas veces difícil el situarlos dentro de la jerarquía del sistema.



**Figura 2:** Organización jerárquica de los distintos precursores hematopoyéticos, caracterizados *in vivo* o *in vitro*, que componen el compartimento pluripotente. Abreviaturas: **CAFC**, células formadoras de áreas *cobblestone*; **CFU-A**, unidad formadora de colonias en agar; **CFU-Blast**, unidad formadora de colonias con morfología blástica; **CFU-Mix**, unidad formadora de colonias mixtas; **CFU-S**, unidad formadora de colonias en bazo; **HPP-CFC**, células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo; **LTC-IC**, células iniciadoras de cultivos de larga duración; **LTRA**, células con capacidad de reconstitución a largo plazo; **MRA**, células con capacidad de repoblación de médula ósea; **STRA**, células con capacidad de reconstitución a corto plazo.

Dentro del compartimento pluripotente, la **unidad formadora de colonias en bazo, CFU-S**, fue el primer precursor clonado (Till y McCulloch, 1961; McCulloch, 1980). Su ensayo se lleva a cabo *in vivo* en ratones irradiados letalmente, en los que tras la inyección intravenosa de células hematopoyéticas tiene lugar la aparición de nódulos en el bazo en número proporcional al número de células inyectadas, representando cada nódulo una CFU-S.

El análisis de estas colonias mostró que eran clonales, es decir procedían de la multiplicación de una sola célula con un alto potencial proliferativo ( $> 10^6$  células por colonia) (Becker y col., 1963; Wu y col., 1967), que contenían células pertenecientes a todas las líneas de diferenciación hematopoyética (Curry y Trentin, 1967) y que si eran reinyectadas en ratones secundarios daban lugar a nuevas colonias en el bazo de los receptores, constatándose su capacidad de automantenimiento (Siminovitch y col., 1963; Schofield y col., 1980). Todas estas evidencias llevaron a definir a la CFU-S como la célula madre, aunque en la actualidad se sabe que la CFU-S representa a un precursor más maduro que dicha célula (Sponcer y col., 1985; Chertkov y col., 1986; Iscove, 1990; Spangrude, 1992) (figura 2).

La población de CFU-S es heterogénea. En un gradiente de densidad, las células de baja densidad relativa tienen una mayor capacidad de automantenimiento que las de alta densidad (Worton y col., 1969). Además, las CFU-S, dependiendo de su grado de diferenciación dan lugar a colonias en bazo en distintos días post-trasplante (Magli y col., 1982; Wolf y Priestley, 1986). Los precursores más maduros forman colonias a los 7-10 días de cultivo (CFU-S<sub>7-10d</sub>), mientras que las CFU-S más primitivas tardan 12 días en desarrollarse (CFU-S<sub>12d</sub>) (Trentin, 1989) (figura 2).

En un lugar más próximo a la célula madre se definió al precursor de la CFU-S, denominado **preCFU-S** (Hodgson y Bradley, 1979; Ploemacher y Brons, 1989), en el que se mide la capacidad de generar CFU-S<sub>12d</sub> en una población celular regenerada en la médula ósea de un receptor letalmente irradiado y trasplantado. A este ensayo no clonal se le denomina **ensayo de capacidad de repoblación de médula ósea (MRA)** (figura 2). En poblaciones purificadas de precursores inmaduros, siempre se ha encontrado un alto enriquecimiento en preCFU-S, lo que ha llevado a que diversos autores la consideren como un representante ciertamente muy próximo a la célula madre (Harrison y col., 1993).

Sin embargo, mediante ensayos de MRA realizados con distintas subpoblaciones celulares de médula ósea, se observó que la reconstitución a corto plazo conferida por la suspensión celular trasplantada no siempre implicaba una posterior reconstitución hematopoyética a largo plazo (Spangrude y Johnson, 1990).

En este sentido, estudios basados en procedimientos de separación celular por tamaño, densidad y fenotipo de superficie, han mostrado que al menos se requieren 2 tipos de células para que ocurra reconstitución hematopoyética, una para el injerto inicial y asegurar la

supervivencia (reconstitución a corto plazo o **STRA**) y otra para la hematopoyesis tardía (reconstitución a largo plazo o **LTRA**) (Spangrude y col., 1988; Jones y col., 1989; Ploemacher y Brons, 1989; Szilvassy y col., 1989; Visser y van Bekkum, 1990) (figura 2).

Hoy día se acepta que el ensayo de **reconstitución a largo plazo (LTRA)** de animales letalmente irradiados es el más apropiado para caracterizar la célula madre (Visser y col., 1984; Karlsson y col., 1988; Bodine y col., 1991). La reconstitución de animales a partir de una única población celular tiene el inconveniente de que puede ocasionar la muerte del ratón receptor por la incapacidad del trasplante para afrontar las necesidades de radioprotección o reconstitución a corto plazo. Ésta es la razón por lo que la estrategia más frecuente de abordar los ensayos de reconstitución a largo plazo es la denominada **repoblación competitiva** (Harrison, 1980; Szilvassy y col., 1990). Para estos ensayos, ratones letalmente irradiados son trasplantados con una población celular singénica y otra diferenciable genéticamente (sexo, antígenos de superficie, etc). Si la población marcada es equivalente o mejor que la singénica respecto a la capacidad de reconstitución a largo plazo, en un número significativo de los receptores predominarán células circulantes portadoras de la marca. Este tipo de ensayo ha permitido estimar que la representatividad de células madre en médula ósea normal es aproximadamente de 1 por  $10^5$  células (Harrison y col., 1990).

Dentro de los ensayos clonogénicos *in vitro* para caracterizar células pluripotentes, la **unidad formadora de colonias mixtas, CFU-Mix** (Johnson y Metcalf, 1977), representa al precursor más maduro dentro del compartimento pluripotente, ya que posee escasa capacidad de formación de colonias secundarias, lo que refleja su baja capacidad de automantenimiento (Hara y Ogawa, 1978; Humphries y col., 1979). Las colonias CFU-Mix contienen células granulocíticas, eritroides, macrofágicas y megacariocíticas, por lo que también se han denominado CFU-GEMM (Fausser y Messner, 1979; Metcalf y col., 1979) (figura 2). Otros precursores con mayor capacidad de automantenimiento son:

La **unidad formadora de colonias en agar, CFU-A** (Pragnell y col., 1988). Este precursor presenta características similares a la CFU-S<sub>12d</sub> (Eckmann y col., 1988; Lorimore y col., 1990) (figura 2).

**Unidad formadora de colonias con morfología blástica, CFU-Blast** (Nakahata y Ogawa, 1982a; 1982b). Una resiembra de estas células da lugar a nuevas colonias blásticas, así como a colonias compuestas por células de varias líneas de diferenciación, lo que demuestra el gran potencial de proliferación y diferenciación de estos precursores, así como su capacidad de automantenimiento (figura 2).

**Célula formadora de colonias con alto potencial proliferativo, HPP-CFC** (Bradley y Hodgson, 1979). Recientemente se han definido varias subclases de este precursor

dependiendo de la combinación de factores de crecimiento hematopoyético presentes en el cultivo (McNiece y col., 1986; 1987; Kriegler y col., 1994). El precursor HPP-CFC de tipo 1 es el más inmaduro, representando a un precursor próximo a la célula MRA (McNiece y col., 1990) (figura 2).

Por otro lado, también dentro del compartimento pluripotente, Ploemacher y col. describieron un ensayo indirecto *in vitro* basado en el crecimiento de células hematopoyéticas murinas sobre estromas funcionales de médula ósea, denominado **células formadoras de áreas Cobblestone, CAFC** (Ploemacher y col., 1989). En estos cultivos, al cabo de 10-28 días, se cuantifican las áreas *cobblestone* o de *empedrado* que representan a precursores hematopoyéticos con distinto grado de madurez según el tiempo transcurrido desde su inicio. Así, las CAFC formadas en el día 10 corresponden a un precursor equivalente a la CFU-S<sub>12d</sub>, mientras que las formadas en el día 28 corresponden a precursores próximos a la célula MRA (Ploemacher y col., 1991) (figura 2). Basándose en el cultivo de CAFC, Sutherland y col. describieron el ensayo de **células iniciadoras de cultivos de larga duración, LTC-IC**, determinándose tras 5-8 semanas de incubación la presencia de áreas *cobblestone* que al igual que las CAFC, representan a precursores hematopoyéticos más o menos inmaduros en función del tiempo de cultivo (Sutherland y col., 1989). Estudios de Fraser y col., sugieren que las células madre en presencia de estroma pueden automantenerse y conservar su capacidad de repoblación pluripotente, lo que llevaría a pensar que al menos algunas LTC-IC representan células estrechamente relacionadas con las células con capacidad de repoblación a largo plazo (Fraser y col., 1990; 1992) (figura 2).

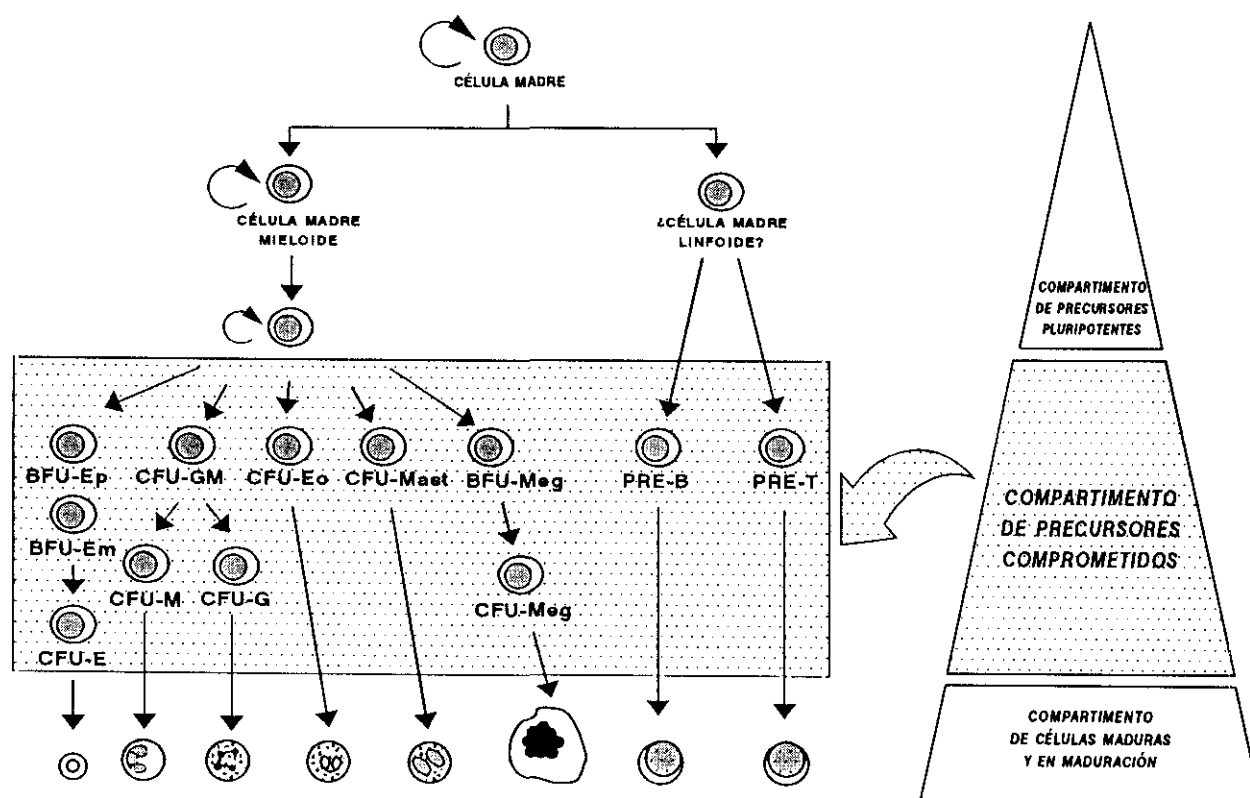
#### 1.1.1.2. Compartimento de precursores comprometidos

A este compartimento de amplificación del sistema hematopoyético pertenecen aproximadamente el 1% del total de células hematopoyéticas. Son precursores que poseen una capacidad de automantenimiento muy restringida, o incluso nula, y una alta tasa proliferativa (figura 1) (Lajtha y col., 1969; Metcalf, 1972). Los precursores de este compartimento están ya comprometidos hacia una ó dos líneas de diferenciación, y su cuantificación se lleva a cabo mediante cultivos *in vitro* en matriz semisólida (Metcalf, 1980) (figura 3).

**Precursores de la línea eritroide:** Estan formados por una población celular heterogénea, definiéndose según su grado de maduración, tres precursores eritroides clonables en ratón (Axelrad y col., 1973; Gregory, 1976): unidad formadora de *burst* o *eclosión* eritroides primitiva, **BFU-Ep**, que requiere 7-8 días para su desarrollo *in vitro*, la unidad formadora de *burst* eritroides madura, **BFU-Em**, que forma colonias tras 4 días de incubación, y la unidad formadora de colonias eritroides, **CFU-E**, más diferenciada, que se puede identificar a los 2-3 días de cultivo (figura 3). Además de IL-3 ó GM-CSF, los precursores eritroides requieren de la presencia de eritropoyetina para su crecimiento (Eaves y Eaves, 1978).

McLeod y col. observaron que en las colonias BFU-E, ocasionalmente aparecían megacariocitos, lo que les hizo postular que los precursores eritroides conservaban una bipotencialidad eritroide-megacariocítica (McLeod y col., 1980). Recientemente se han obtenido evidencias de que los precursores megacariocíticos y eritroides comparten un precursor más inmaduro común, lo que explicaría las observaciones de McLeod y col. (McDonald y Sullivan, 1993).

**Precursores de la línea granulomacrofágica, CFU-GM:** Fue el primer precursor clonado sobre matriz semisólida (Bradley y Metcalf, 1966). Las colonias se cuantifican después de 7 días de incubación, formándose diversos tipos de colonias según su composición sea mayoritaria en granulocitos, en macrófagos o en ambos tipos celulares (figura 3). Las colonias están constituidas por una población celular muy heterogénea, existiendo entre las células diferencias de tamaño, densidad, capacidad de automantenimiento y respuesta a estímulos (Metcalf y McDonald, 1975; Williams y Jackson, 1977; Bol y Williams, 1980). Para que el precursor CFU-GM de lugar a colonias *in vitro* se requiere la presencia de IL-3 ó GM-CSF, factores que pueden ser sustituidos por G-CSF ó M-CSF.



**Figura 3:** Compartimento de precursoros hematopoyéticos comprometidos. Abreviaturas: **BFU-E**, unidad formadora de *burst* eritroides; **BFU-Meg**, unidad formadora de *burst* de megacariocitos; **CFU-E**, unidad formadora de colonias eritroides; **CFU-Eo**, unidad formadora de colonias de eosinófilos; **CFU-G**, unidad formadora de colonias de granulocitos; **CFU-GM**, unidad formadora de colonias grulo-macrofágicas; **CFU-M**, unidad formadora de colonias de macrófagos; **CFU-Mast**, unidad formadora de colonias de mastocitos; **CFU-Meg**, unidad formadora de colonias megacariocíticas; **Pre-B**, precursores de linfocitos B; **Pre-T**, precursores de linfocitos T.

**Precursores de la línea megacariocítica:** Su cultivo *in vitro* se describió en 1975 (Metcalf y col., 1975). Posteriormente se ha descrito la existencia de precursores con diferente grado de maduración (Levin, 1983; Chatelain y col., 1988; Williams, 1990; Long, 1993): la unidad formadora de *burst* de megacariocitos, **BFU-Meg**, que requiere 14 días para su desarrollo y la unidad formadora de colonias megacariocíticas, **CFU-Meg**, más diferenciada y que crece en cultivo tras 7 días de incubación. Los precursores de megacariocitos crecen en presencia de IL-3, si bien son sensibles a IL-6, Epo y trombopoyetina, factores que sinergizan con la IL-3 aumentando el número de colonias de megacariocitos *in vitro* (Metcalf, 1994). En ratón, las colonias megacariocíticas se pueden identificar por su actividad acetilcolinesterasa.

**Precursores de eosinófilos, CFU-Eo:** Las colonias de eosinófilos crecen en cultivos semisólidos al añadir medio condicionado de bazo estimulado con mitógeno (Metcalf y col., 1974). En este ensayo clonal, la proliferación y diferenciación de eosinófilos no refleja la capacidad real de la médula ósea para producir eosinófilos. Debido a esto, se han ideado otro tipo de ensayos en cultivo líquido que permiten cuantificar dicha capacidad (Strath y Sanderson, 1985). Este precursor está regulado por los factores IL-3 e IL-5 que actúan de forma sinérgica (Sanderson y col., 1985).

**Precursores de mastocitos/basófilos, CFU-Mast/Baso:** Pharr y col. han descrito dos tipos de colonias de mastocitos, colonias compuestas únicamente por mastocitos y que se encuentran en una baja proporción en médula ósea y en sangre periférica (CFU-Mast/Baso) y colonias mixtas compuestas por mastocitos y células de otras líneas hematopoyéticas (Pharr y col., 1984). Este tipo de colonias se desarrollan en cultivos semisólidos tras la incubación durante 15 días en presencia de medio condicionado de bazo estimulado con mitógeno y Epo.

#### 1.1.1.3. Compartimento de células maduras y en proceso de maduración

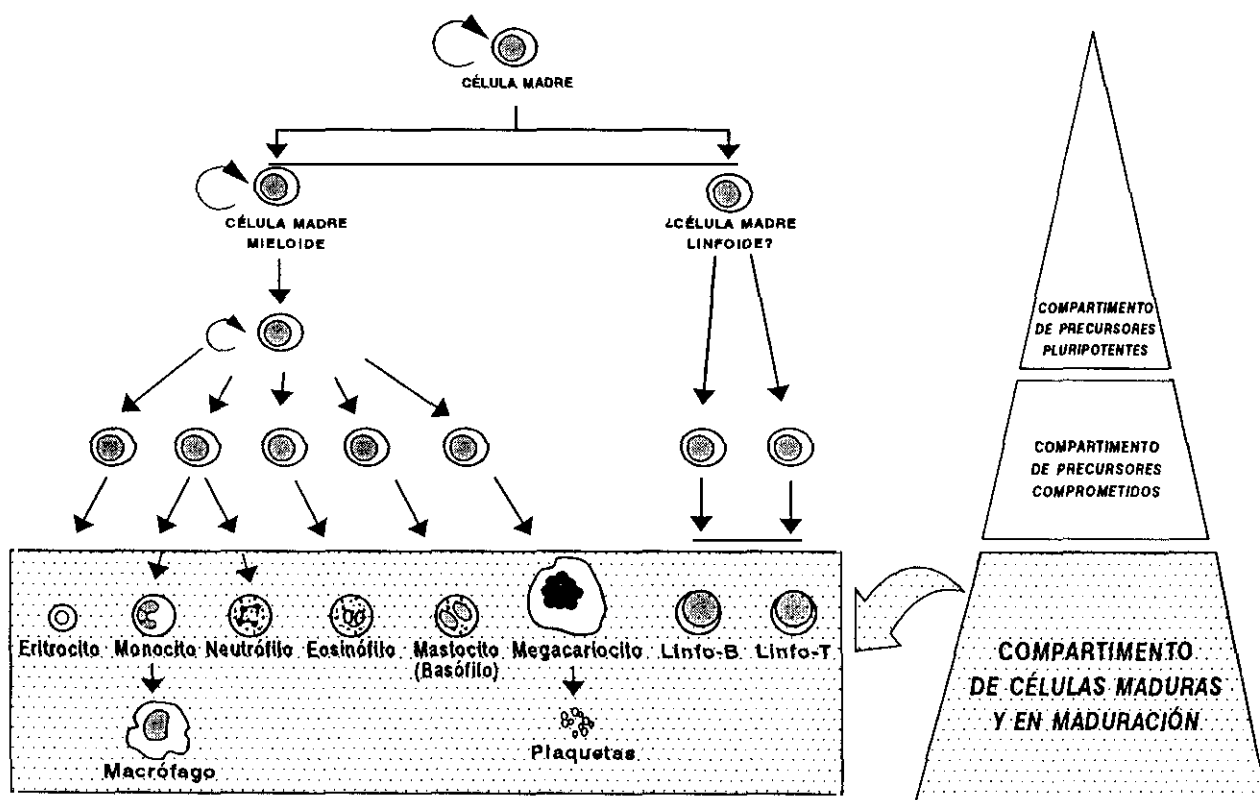
En este compartimento se engloban más del 95% del total de células hematopoyéticas. Son morfológicamente reconocibles, sin potencial de automantenimiento y proliferativamente activas en estadios inmaduros (figura 1). En circunstancias normales, la proliferación de la mayor parte de las células de este compartimento cesa cuando la célula ha madurado completamente, migrando en la mayoría de los casos al torrente sanguíneo. Las células ya maduras, circulantes, se agrupan en células rojas o eritrocitos, células blancas o leucocitos y plaquetas (Metcalf y Moore, 1971) (figura 4).

Los **eritrocitos** de mamíferos carecen de núcleo y por lo tanto, no tienen capacidad de síntesis de ADN. Sus mitocondrias y los restantes orgánulos, limitados por membrana, también se pierden. Con esta simplificación estructural, este tipo de células sanguíneas están especializadas en la función primaria de transportar oxígeno de los pulmones a los tejidos y dióxido de carbono en sentido contrario.

Los **leucocitos** son células nucleadas cuya función principal es la de participar en la defensa del organismo. A este tipo celular pertenecen tanto células de la línea linfóide, linfocitos T y B, como de la línea mieloide, monocitos y los tres tipos de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (figura 4).

Las **plaquetas** formadas en la médula ósea a partir de megacariocitos son también anucleadas en los mamíferos (figura 4). Su función principal es la de recubrir pequeños defectos del revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos y la de evitar las hemorragias promoviendo la coagulación local de la sangre.

En la formación de estas células maduras, la pérdida de la capacidad proliferativa del compartimento de precursores comprometidos se acompaña con un desarrollo progresivo de las características bioquímicas, antigénicas y morfológicas de cada línea de células maduras. Así sucede para las líneas eritroide, granulocítica y megacariocítica. No obstante, ciertas células maduras mantienen la capacidad de proliferación al ser estimuladas apropiadamente, entre éstas se incluyen los linfocitos T y B, mastocitos y algunos macrófagos tisulares.



**Figura 4:** Compartimento de células maduras y en proceso de maduración.



Para completar la lista de células que comprende el sistema hematopoyético es necesario incluir a aquellas células que originadas en los órganos hematopoyéticos se asientan en diversos tejidos. Este grupo incluye a los distintos macrófagos tisulares (células de Kupffer del hígado y macrófagos alveolares), los osteoclastos de médula y las células de Langerhans de la piel (Friedenstein y col., 1974). Así mismo, existe evidencia de que las células endoteliales tienen un origen hematopoyético al igual que las células NK (*natural killer*) y las células dendríticas del tejido linfoide (Keating y col., 1982; Silva y col., 1993).

### **1.1.2. Regulación del sistema hematopoyético**

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, en el sistema hematopoyético, a partir de una pequeña población de células madre se van a originar una gran diversidad de tipos celulares, lo que implica la necesidad de unos mecanismos de regulación perfectamente coordinados para mantener la homeostasis del sistema. Estos mecanismos de regulación no sólo actúan en situaciones normales manteniendo el equilibrio entre procesos de proliferación, diferenciación y maduración, sino que han de permitir controlar respuestas rápidas del sistema hematopoyético frente a situaciones de emergencia en donde se requiera una mayor producción de alguno o todos los tipos de células en sangre.

Se han propuesto al menos 3 modelos no excluyentes para explicar cómo tiene lugar la regulación del sistema hematopoyético:

- El **modelo estocástico** propone que la decisión de una célula madre en condiciones fisiológicas para automantenerse o para diferenciar está determinada por un mecanismo aleatorio que es intrínseco a la propia célula (Till y McCulloch, 1964; Humphries y col., 1981). Posteriormente, Ogawa y col. propusieron que el compromiso de precursores hematopoyéticos pluripotentes hacia una línea de diferenciación también sería un proceso estocástico (Ogawa y col., 1983; Gordon y Amos, 1994).
- El **modelo del microambiente hematopoyético inductivo**, descrito por Trentin, propone que la regulación de la hematopoyesis tiene lugar a través del microambiente (Trentin, 1970). Posteriormente, Schofield propuso que las células madre se localizan en dominios del estroma de la médula ósea a los cuales denominó *nichos* hematopoyéticos, donde la célula madre se mantiene quiescente (Schofield, 1978). En el *nicho* hematopoyético se definen las condiciones tanto celulares como humorales que permiten que la célula madre se automantenga. Por otra parte, el microambiente también intervendría en las etapas finales de diferenciación de las células hematopoyéticas, creando el entorno adecuado para el alojamiento de cada tipo celular y determinando las etapas finales de maduración y organización celular dentro de los tejidos (Dexter y col., 1979).

- **Modelo de las restrictinas.** Zipori y col. observaron que en presencia de estroma, las células madre se automantenían en cultivo, proceso que no se había observado en presencia únicamente de factores hematopoyéticos (Zipori y col., 1988; Zipori, 1990). Así, estos autores proponen que el estroma produciría toda una serie de factores hematopoyéticos, las *restrictinas*, encargadas de restringir y limitar las opciones de crecimiento y diferenciación de que disponen las células. En el término restrictinas se englobarían todos los factores de crecimiento e inhibidores hematopoyéticos, así como diversos factores producidos por el estroma aún no caracterizados. Las restrictinas actuarían bien como antagonistas de la diferenciación (factores de renovación) o como inductoras de diferenciación.

Teniendo en cuenta estos tres modelos, se considera que en la regulación del sistema hematopoyético intervienen dos componentes, uno **humoral**, en donde se englobarían los distintos factores hematopoyéticos (factores de crecimiento e inhibidores) y otro **celular**, compuesto por las células estromales y la matriz extracelular. Aunque ambos tipos de regulación actúan simultáneamente y en estrecha cooperación, formando el microambiente hematopoyético, en este apartado se van a presentar por separado ya que esto facilita su exposición.

#### 1.1.2.1. Regulación humoral de la hematopoyesis

Si bien la eritropoyetina fue descrita en el año 1906, hasta mediados de los años 60, cuando se describieron las diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de precursores hematopoyéticos, no se pudo avanzar en el conocimiento de los distintos factores de crecimiento e inhibidores que intervienen en la regulación humoral del sistema hematopoyético.

Así, mediante el uso de técnicas de cultivo *in vitro* de precursores, se puso de manifiesto que los factores de crecimiento eran esenciales no sólo para que los precursores sobrevivieran, sino también para que proliferaran y diferenciaran (Golde, 1984; Metcalf, 1984a; 1984b; Dexter y White, 1990). Además, estas técnicas constituían un modelo idóneo para determinar la presencia de factores activos en extractos de tejidos o en medios condicionados. Por tanto, el uso de cultivos semi-sólidos de precursores permitió detectar, aislar y caracterizar la gran variedad de factores de crecimiento e inhibidores implicados en la regulación humoral del sistema hematopoyético. En la actualidad se conocen más de 20 factores de crecimiento hematopoyético distintos, a los que hay que añadir toda una serie de factores inhibidores (Lord y Wright, 1982; Metcalf y Merchav, 1982; Axelrad, 1990; Heyworth y col., 1990; Anagnostou y col., 1991; Guigon y col., 1993).

En este apartado se va a intentar dar una idea general de la regulación humoral del sistema hematopoyético, sin entrar a describir individualmente el papel de cada factor hematopoyético en dicha regulación, información que se recoge en las tablas I y II, y en la figura 5.

FACTOR	ABREVIATURA	LUGAR DE SINTESIS	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
Eritropoyetina	Epo	Riñón, hígado	Crecimiento y diferenciación de precursores eritroides. Sinergiza para estimular precursores de megacariocitos	Jacobs y col., 1985; Krantz, 1991
Factor estimulador de colonias de granulocitos	G-CSF	Macrófagos, neutrófilos, células T, células endoteliales, fibroblastos	Crecimiento de colonias de neutrófilos y macrófagos <i>in vitro</i> . Diferenciación y activación de neutrófilos. Sinergiza para estimular precursores pluripotentes	Metcalf y Nicola, 1983; Souza y col., 1986; Koeffler y col., 1987
Factor estimulador de colonias granulo-macrofágicas	GM-CSF	Macrófagos, mastocitos, eosinófilos, células T, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales	Estimula células de las líneas de granulocitos, macrófagos, eosinófilos y megacariocitos. Crecimiento y diferenciación de precursores pluripotentes	Metcalf y col., 1980; Wong y col., 1985; Koury y Pragnell, 1987; Thorens y col., 1987
Factor estimulador de colonias de macrófagos	M-CSF	Células T, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales	Crecimiento de precursores de macrófagos y neutrófilos. Estimula varias funciones de monocitos y macrófagos	Kawasaki y col., 1985; Gualtieri y col., 1987; Fibbe y col., 1988
<i>Stem Cell Factor</i> o factor estimulador de células madre	SCF	Células del estroma de médula ósea, células endoteliales, fibroblastos, células de Sertoli	Estimula mastocitos. Sinergiza para estimular precursores mieloides, eritroides, linfoides y pluripotentes	Huang y col., 1990; Zsebo y col., 1990; Anderson y col., 1990
Interleuquina-1 ( $\alpha$ , $\beta$ )	IL-1 ( $\alpha$ , $\beta$ )	Monocitos-macrófagos, linfocitos, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales, multitud de tipos celulares	Multitud de efectos sobre la diferenciación y función de células implicadas en la respuesta inmune e inflamatoria. También afecta al sistema nervioso central y endocrino. Sinergiza para estimular precursores pluripotentes	Mochizuki y col., 1987; Dinarello, 1989; Di Giovine y Duff, 1990; Dinarello, 1991
Interleuquina-3	IL-3	Células T, células endoteliales, células epiteliales tímicas, queratinocitos, neuronas, mastocitos	Sinergiza para estimular la producción y diferenciación de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, megacariocitos, mastocitos, basófilos y células eritroides. Mantiene proliferación de precursores pluripotentes	Cannistra y col., 1988; Wimperis y col., 1989; Morris y col., 1990; Tsuji y col., 1990
Interleuquina-6	IL-6	Células T, monocitos-macrófagos, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, neuronas	Activa precursores hematopoyéticos y acorta su período $G_0$ . Induce crecimiento y/o diferenciación de células B, células T y megacariocitos. Síntesis de proteínas de fase aguda. Sinergiza para estimular precursores pluripotentes	Ikebuchi y col., 1987; Gaudie y col., 1987; Caracciolo y col., 1989; Hirano y col., 1990

Tabla Ia: Factores hematopoyéticos (Sporn y Roberts, 1988; Whetton y Dexter, 1989; Heyworth y col., 1990).

FACTOR	ABREVIATURA	LUGAR DE SINTESIS	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
Interleuquina-2	IL-2	Células T	Proliferación y diferenciación de células T. Proliferación y secreción Ig de células B activadas. Actividad citolítica de células NK y producción de células LAK	Smith, 1988; Minami, 1993
Interleuquina-4	IL-4	Células T y B, macrófagos, mastocitos, basófilos, células de estroma de médula ósea	Proliferación y diferenciación de células B, T y NK, mastocitos	Yokota y col., 1988; Paul, 1991
Interleuquina-5	IL-5	Células T, mastocitos	Crecimiento y diferenciación de eosinófilos, también activa su función y actúa de quimiotáctico	Takatsu y col., 1988, Sanderson y col., 1988
Interleuquina-7	IL-7	Células de estroma de médula ósea y células de hígado fetal	Mantiene crecimiento de células Pro- y Pre-B, células T	Henney, 1989
Interleuquina-8	IL-8	Macrófagos tisulares, células T, fibroblastos, multitud de tipos celulares	Actividad quimiotáctica <i>in vitro</i> para neutrófilos, células T y basófilos. Adhesión de neutrófilos a células endoteliales	Oppenheim, 1991
Interleuquina-9	IL-9	Células T	Sinergiza con Epo para mantener el crecimiento de BFU-E. Potencia supervivencia de células T <i>in vitro</i>	Yang, 1992
Interleuquina-10	IL-10	Células T, macrófagos, queratinocitos, células B	Inmunosupresor de la función macrofágica. Proliferación de células B y secreción de inmunoglobulinas	Thompson-Snipes y col., 1991
Interleuquina-11	IL-11	Fibroblastos, trofoblastos	Sinergiza con IL-3 para aumentar tamaño, número y ploidía de colonias de megacariocitos. Precursores mieloides y células B. Sinergiza para estimular precursores pluripotentes	Musashi y col., 1991
Interleuquina-12	IL-12	Células B, macrófagos	Crecimiento y actividad funcional de células NK y T. Diferenciación de células T	Scott, 1993
Trombopoyetina o ligando c-Mpl	ML	Hígado, riñón	Proliferación y diferenciación de línea megacariocítica	Lok y col., 1994; Sauvage y col., 1994
Factor estimulador de colonias de células pre-B	PBEF	Médula ósea, hígado, músculo	Proliferación de precursores tempranos de la línea B	Samal y col., 1994
Ligando de flt3/flk2	flt3/flk2	Células T	Precursores hematopoyéticos primitivos	Lyman y col., 1993

Tabla Ib: Factores hematopoyéticos, continuación.

FACTOR	ABREVIATURA	LUGAR DE SINTESIS	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
Pentapéptido (P Glu-Glu-Asp-Cys-Lys)	pEEDCK	Leucocitos	Mantenimiento de la CFU-S, preCFU-S y CFU-GM en un estado de baja proliferación	Paukovits y Laerum, 1982; Paukovits y col., 1990; Paukovits y col., 1991
Seraspenide (tetrapéptido N-Acetil-Ser-Asp-Lys-Pro)	AcSDKP	?	Impide la entrada de CFU-S y HPP-CFC en ciclo. Disminuye números de neutrófilos, monocitos y la tasa proliferativa de CFU-GM, BFU-E y CFU-Mix	Frindel y Guigon, 1977; Lenfant y col., 1989; Frindel y Monpezat, 1989
Interferón- $\gamma$	IFN $\gamma$	Células T, células NK	Actividad antiviral. Estimulación de la función macrofágica. Papel en la protección del compartimento pluripotente frente a un estrés hematopoyético	Farrar y Schreiber, 1993; Snoeck y col., 1994
Factor inhibidor de leucemias	LIF	Células de estroma de médula ósea, fibroblastos, células T, monocitos-macrófagos, osteoblastos, blastocistos, astrocitos	Mantiene el fenotipo pluripotente de células madre embrionarias. Estimula proliferación de precursores hematopoyéticos dependientes de IL-3	Metcalf, 1991
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$	MIP-1 $\alpha$	Células T y B, monocitos, mastocitos, fibroblastos	Inhibe proliferación de células madre pero puede ser estimuladora de precursores menos primitivos. Quimiotáctico para monocitos, células T y eosinófilos	Davatelis y col., 1988; Graham y col., 1990; Broxmeyer y col., 1990; Plumb y col., 1991
Factor de crecimiento transformante $\beta$	TGF $\beta$	Fibroblastos, monocitos, plaquetas, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos	Inhibe la proliferación y diferenciación de precursores hematopoyéticos inmaduros y de multitud de tipos celulares	Sporn y col., 1987; McNiece y col., 1992; Keller y col., 1992
Factor de necrosis tumoral $\alpha$	TNF $\alpha$	Neutrófilos, linfocitos activados, células NK, células LAK, astrocitos, células endoteliales	Amplio espectro de efectos debido a su capacidad para mediar la expresión de genes de factores hematopoyéticos, factores de transcripción, receptores, mediadores inflamatorios y proteínas de fase aguda. Inmunoestimulador y mediador de la respuesta inflamatoria	Beutler y Cerami, 1986; Beutler y Cerami, 1989; Vilcek y Lee, 1991; Kossodo y col., 1992

Tabla II: Inhibidores hematopoyéticos (Anagnostou y col., 1991; Guigon y col., 1993).

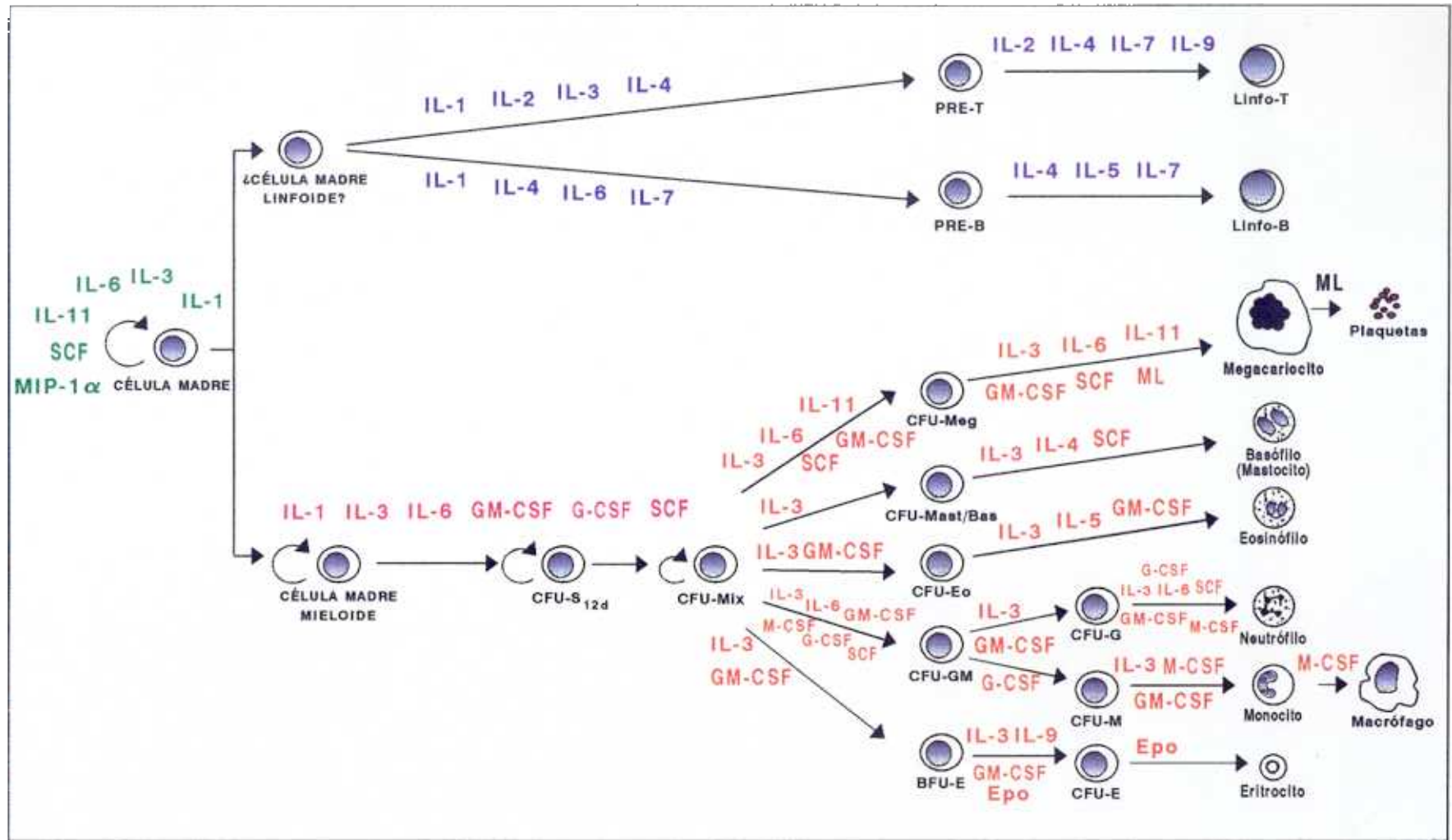


Figura 5: Función de los factores hematopoyéticos en la regulación del sistema hematopoyético.

Las funciones asociadas a las diferentes moléculas reguladoras descritas incluyen la estimulación o inhibición de la proliferación y diferenciación de precursores hematopoyéticos, supervivencia *in vitro*, automantenimiento, así como la potenciación de la función de las células hematopoyéticas maduras.

Cuando comenzaron a caracterizarse los diferentes factores reguladores hematopoyéticos se observó que algunos de estos factores tenían funciones similares o solapadas, lo que llevó a pensar que había más factores de los que realmente serían necesarios (Metcalf, 1984b; 1993). Esta redundancia se ponía de manifiesto al observarse que diferentes factores tenían los mismos efectos sobre un determinado tipo celular. Por ejemplo, la IL-3, GM-CSF y G-CSF son capaces de inducir la formación de colonias granulo-macrofágicas *in vitro* (figura 5).

Con el uso de anticuerpos monoclonales específicos frente a factores reguladores, así como de ratones transgénicos defectivos en algún factor, se han obtenido evidencias que ponen de manifiesto el papel esencial de los factores hematopoyéticos, a pesar de su redundancia. En este sentido, la inyección de anticuerpos específicos anti-eritropoyetina demostró que la presencia de este factor es esencial para que la eritropoyesis sea normal (Schooley y García, 1962). En un estudio similar, se observó que la administración de anticuerpos anti G-CSF produce neutropenia, poniendo de manifiesto que el G-CSF desempeña un papel importante en la producción basal de granulocitos, función que no puede ser compensada por otros factores como el GM-CSF o la IL-3 (Hammond y col., 1991). Mediante estudios en ratones transgénicos defectivos para el M-CSF, se ha demostrado el papel esencial de este factor en la formación de osteoclastos y algunos macrófagos (Yoshida y col., 1990; Wiktor-Jedrzejczak y col., 1991). Actualmente se trabaja en el desarrollo de animales con delección o inactivación de genes para otros factores (Lieschke y col., 1994).

Estas evidencias muestran que esa aparente redundancia permite al sistema hematopoyético ser mucho más flexible, y por tanto, que tenga una mayor capacidad de respuesta frente a diversas situaciones de demanda celular (Metcalf, 1993).

Aunque es indiscutible la importancia de la información obtenida de los estudios *in vitro* con factores hematopoyéticos, el demostrar que estos factores estaban presentes en condiciones fisiológicas fue un paso decisivo para aceptar su papel en la regulación humoral del sistema hematopoyético. En relación al papel fisiológico de los factores cabe destacar: (1) La demostración de que los genes que codifican para los factores de crecimiento existen en el genoma de mamíferos. (2) El hecho de que los efectos observados *in vitro* con los factores hematopoyéticos se reprodujeran *in vivo*, lo que implicaba que los efectos observados *in vitro* con estas moléculas no eran un artefacto de la metodología empleada. (3) La observación de que en ratones mutantes deficientes para un factor concreto, dicha deficiencia podía compensarse con la administración exógena del factor, ha demostrado que los factores hematopoyéticos tienen un papel fundamental *in vivo* para que tenga lugar una hematopoyesis normal.

A la hora de explicar cómo los factores hematopoyéticos regulan *in vivo* la hematopoyesis, hay que distinguir dos niveles: por un lado, su acción sobre la función de células maduras, y por otro, la influencia que estos factores tienen sobre el desarrollo de precursores comprometidos y células madre hematopoyéticas.

En relación con la función de células maduras, cuando un tejido resulta dañado, las células de alrededor responden produciendo una serie de factores de crecimiento entre los que se encuentran la IL-1, GM-CSF, G-CSF y M-CSF. Una vez producidos los factores, éstos van a actuar como factores quimiotácticos, atrayendo hacia la zona dañada diversos tipos de células maduras como granulocitos y macrófagos entre otros. Asimismo, los factores también van a actuar aumentando la actividad funcional de estas células maduras. Una vez reparado el daño, la producción de factores vuelve progresivamente al estado estacionario normal. Si bien ésta es una visión muy simplificada de lo que ocurre, en la que no se tienen en cuenta respuestas simultáneas de otros tipos celulares, constituye un modelo válido.

A nivel de precursores comprometidos y células madre hematopoyéticas, la situación es mucho más compleja, ya que no sólo hay que producir el número adecuado de células maduras para reponer el daño, sino que hay que asegurar que se mantenga el equilibrio entre procesos de diferenciación y automantenimiento (Dexter y col., 1984b). En un intento de determinar cómo se regulan esos procesos a nivel de precursores hematopoyéticos, los experimentos *in vitro* han aportado mucha información sobre el factor o factores que determinan la proliferación de un determinado precursor.

Los precursores comprometidos se pueden estimular *in vitro* con factores individuales, aunque se ve aumentada su proliferación si el cultivo se realiza en presencia de dos o más factores hematopoyéticos, pudiéndose también conseguir un aumento en el número de colonias formadas en el cultivo. *In vivo*, se reproduce el rango de acción de los factores establecido previamente en estudios *in vitro*, tanto cuando se administran múltiples factores como individualmente. Por ejemplo, el G-CSF produce grandes aumentos de granulocitos en sangre periférica cuando se administra de forma exógena (Dührsen y col., 1988).

La regulación humoral a nivel de precursores pluripotentes es mucho más compleja como se ha observado en ensayos *in vitro*. Gracias al desarrollo de distintas técnicas de cultivo de precursores hematopoyéticos del compartimento pluripotente y de la caracterización fenotípica de estos precursores, en numerosos ensayos se ha mostrado que para que estos precursores proliferen se requiere la presencia de múltiples factores y que a medida que se aumenta el número de factores añadidos, el precursor analizado es más inmaduro (Migliaccio y col., 1991; Li y Johnson, 1992; Miura y col., 1993). La dificultad del estudio de células madre *in vitro* ha hecho que la regulación humoral de éstas sea prácticamente desconocida.



Teniendo en cuenta los resultados de experimentos *in vitro*, donde la célula madre no se automantiene y los precursores proliferan en presencia de factores hematopoyéticos, todo parece indicar que la célula madre *in vivo* debe estar protegida en el nicho hematopoyético, lo que hace que se mantenga a niveles constantes a lo largo de la vida del individuo. En cuanto abandona el nicho quedaría expuesta a toda una serie de factores del microambiente que la harían proliferar y diferenciar, al igual que tiene lugar en los experimentos *in vitro* (Dexter y col., 1977; Schofield, 1978).

Así, los datos de regulación humoral *in vitro*, en ausencia de estroma funcional, estarían mucho más relacionados con la regulación del sistema hematopoyético en una situación de estrés, mientras que en condiciones estacionarias donde los niveles de factores hematopoyéticos son prácticamente indetectables, el estroma hematopoyético de la médula ósea debe ser fundamental en la regulación del sistema.

#### **1.1.2.2. Regulación celular de la hematopoyesis: estroma hematopoyético**

El hecho de que la hematopoyesis tenga lugar exclusivamente en determinados tejidos del organismo, pone de manifiesto el papel decisivo que desempeña el estroma en el proceso de la hematopoyesis y en su regulación. En la regulación celular no sólo van a intervenir los distintos tipos de células estromales, sino que también la matriz extracelular va a desempeñar un papel importante.

El estroma hematopoyético, si bien en un principio se pensó que podía ser un simple soporte de células hematopoyéticas, hoy se sabe que tiene un papel directo e indirecto en la regulación del sistema hematopoyético, lo cual, se puso de manifiesto fundamentalmente mediante estudios en ratones mutantes y cultivos de larga duración de médula ósea (LTBMCs).

Existen cepas de ratones con mutaciones en los loci W o Steel del cromosoma 5 y 10 respectivamente (W/W<sup>v</sup> y Sl/Sl<sup>d</sup>) que se caracterizan por presentar una anemia macrocítica. El estudio de estos ratones mutantes puso de manifiesto que el origen de la anemia en ambas cepas era diferente. Los ratones mutantes W/W<sup>v</sup> tienen un estroma hematopoyético normal pero muestran un defecto en la población de células madre. En estos ratones la anemia se cura si se les practica un trasplante de médula ósea convencional (McCulloch y col., 1964). Los ratones Sl/Sl<sup>d</sup> tienen una población de células madre normal, pero un estroma hematopoyético defectivo. En este caso, un trasplante de médula ósea no lleva a la desaparición de la anemia (McCulloch y col., 1965). Estos resultados demostraban que son necesarias tanto una población de células madre normal como un estroma funcional para que tenga lugar una hematopoyesis correcta (Dexter y Moore, 1977).

El desarrollo de la técnica de cultivo de larga duración de médula ósea en 1974, supuso un paso decisivo no sólo para clarificar el papel regulador del estroma, sino también para el conocimiento de la estructura y la función de dicho estroma (Dexter y Lajtha, 1974; Dexter y col., 1977; Testa y Dexter, 1977; Williams y col., 1977; 1978; Jones-Villeneuve y Philips, 1980; Dexter y col., 1981). En el LTBM, sobre un estroma hematopoyético tienen lugar procesos de proliferación y diferenciación de células madre hematopoyéticas por largos períodos de tiempo, reproduciéndose *in vitro*, la hematopoyesis que tiene lugar *in vivo* en la médula ósea.

Utilizando el LTBM se obtuvieron diversas evidencias que demostraban la importancia del estroma en la regulación hematopoyética (Dexter y col., 1984a): (a) Cuando las células de médula se cultivaban en placas siliconizadas, que impiden la adherencia de las células, no se mantenía la hematopoyesis (Dexter y col., 1977). (b) Células del estroma de otros órganos, incluido el bazo, no eran capaces de mantener la hematopoyesis (Reimann y Burger, 1979). (c) La médula ósea de ratones Sl/Sl que tienen un estroma defectivo, no era capaz de formar una capa adherente funcional que mantuviera la hematopoyesis.

Con el uso de LTBM también se demostró que además de ser necesaria la presencia de un estroma funcional, las interacciones entre células hematopoyéticas y células estromales son imprescindibles para que se mantenga la hematopoyesis (Bentley, 1981). Así, diversos autores mostraron que el contacto directo entre células del estroma y células hematopoyéticas facilita el automantenimiento, la supervivencia y el desarrollo tanto *in vivo* como *in vitro* de dichas células (Dexter y col., 1977; Coulombel y col., 1981; Kodama y col., 1984; Spooncer y col., 1986; Hunt y col., 1987; Whitlock y col., 1987; Roberts y col., 1988; Itoh y col., 1989). La gran heterogeneidad del estroma medular ha dificultado el estudio de interacciones de células concretas del estroma con células hematopoyéticas (Quesenberry, 1990). Para este tipo de estudios se utilizan líneas celulares establecidas, al constituir poblaciones más homogéneas (Zipori y col., 1985).

En apoyo de la teoría del nicho hematopoyético postulada por Schofield en 1978, se ha observado que la interacción célula madre-células estromales es fundamental para el automantenimiento de la célula totipotente. Si la célula madre pierde este contacto, abandonando el nicho hematopoyético, queda expuesta a toda una serie de agentes externos que la inducirían a diferenciar (Dexter y col., 1977; Schofield, 1978).

El estroma también interviene en la regulación hematopoyética mediante la liberación de toda una serie de factores de crecimiento hematopoyético. Existen numerosos trabajos realizados en LTBM, en los que se describe que las células del estroma producen diversos factores hematopoyéticos (Gualtieri y col., 1982; Heard y col., 1982; Shaddock y col., 1983; Kittler y col., 1992), si bien las concentraciones de éstos no son muy elevadas (Tavassoli y col., 1990). Ésto podría deberse a que la producción de factores de crecimiento hematopoyético

esté regulada de tal manera, que sólo se produce la cantidad de factor necesaria para saturar los receptores presentes en los precursores (Tushinski y col., 1982).

Otro componente del estroma hematopoyético implicado en la regulación del sistema hematopoyético, es la **matriz extracelular**. La matriz extracelular es una estructura altamente organizada secretada por células del estroma que, además de proporcionar un anclaje para los precursores hematopoyéticos, está implicada en la regulación de su proliferación y diferenciación, ya que es capaz de retener y presentar los diversos factores a las células hematopoyéticas. Esta matriz está constituida por colágeno, laminina, fibronectina, fibrinógeno, hemonectina, proteoglicanos y moléculas de adhesión celular (Zuckerman y col., 1989).

El **colágeno** del tipo I, III y IV secretado por los fibroblastos constituye la estructura que mantiene la integridad física y funcional del estroma hematopoyético (Gay y col., 1989).

La **laminina** secretada por las células endoteliales y la **fibronectina** secretada por los macrófagos del estroma, son proteínas que contienen el péptido de adhesión Arg-Gly-Asp (RGD). Este péptido está implicado en la unión entre células hematopoyéticas y el estroma (Minguell y col., 1992). Los procesos de maduración de los precursores de la línea eritroide están asociados a cambios en los receptores de fibronectina (Vuillet-Gaugler y col., 1990).

El **fibrinógeno**, proteína presente en la regeneración de tejidos como la médula ósea, es a su vez responsable de la agregación de plaquetas y adhesión celular endotelial. También es un agente mitogénico, así como potenciador del efecto estimulador de la IL-3 (Zhou y col., 1993).

La **hemonectina**, es capaz de promover la unión de células de la estirpe granulocítica al estroma. Esta unión disminuye al aumentar el grado de diferenciación de las células granulocíticas, lo que podría representar un mecanismo de liberación de células maduras a la circulación periférica (Campbell y col., 1987; Peters y col., 1990). También promueve la unión de precursores CFU-GM y BFU-E al estroma hematopoyético.

Otras proteínas de la matriz extracelular son los **proteoglicanos**, moléculas muy complejas con numerosas cadenas de glicosaminoglicanos unidas a un núcleo proteico (Spooncer y col., 1983; Wight y col., 1986; Minguell y Tavassoli, 1989). El interés sobre estas moléculas surgió al observarse que ciertos proteoglicanos estaban localizados en áreas concretas del bazo, en donde estaba teniendo lugar una fuerte actividad hematopoyética (McCuskey y col., 1972).

El glicosaminoglicano heparán sulfato puede unir de forma selectiva GM-CSF e IL-3, presentándoselos después a precursores hematopoyéticos (Roberts y col., 1988). Esta

interacción constituye una forma de almacenamiento de estos factores, pudiendo también ser necesaria para su presentación a las células hematopoyéticas en una forma biológicamente activa.

Otros componentes de la matriz extracelular son las **moléculas de adhesión celular (CAM)**, las cuales se han identificado en precursores eritroides, mieloides y linfocitos, así como en las células de estroma con las que interaccionan. La molécula de adhesión celular ICAM-1 es expresada por precursores eritroides y mieloides, perdiéndose su expresión al aumentar el grado de diferenciación de estos precursores (Arkin y col., 1991).

## **1.2. EFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO**

La caracterización de la radiosensibilidad y la recuperación de los diferentes compartimentos del sistema hematopoyético tras la exposición a radiación, tiene importantes implicaciones en la optimización de los tratamientos antitumorales, así como en el tratamiento de víctimas de accidentes radiológicos. Antes de iniciar la descripción de los efectos de las radiaciones ionizantes sobre el sistema hematopoyético, se comentarán algunos conceptos básicos de radiobiología (Thames y Hendry, 1987; Hall, 1988).

Las fuentes de radiación más comunmente utilizadas en radioterapia son los rayos X o los rayos  $\gamma$ . Ambas son formas de radiación electromagnética de baja transferencia lineal de energía (LET) que no se diferencian por sus propiedades, sino por la forma en que se producen. Los rayos X tienen su origen en la corteza del átomo y los rayos  $\gamma$  proceden del núcleo.

Cuando la radiación ionizante interacciona con el material biológico tienen lugar una serie de acontecimientos físico-químicos que van a producir un cambio biológico final. Según la naturaleza del daño producido, los efectos biológicos de las radiaciones se pueden clasificar en efectos estocásticos y efectos deterministas.

En los efectos **estocásticos**, la probabilidad de que ocurra el efecto, pero no directamente la gravedad del mismo, depende de la dosis de radiación. Este tipo de efectos está relacionado con la aparición de mutaciones cromosómicas, bien en células germinales (efectos estocásticos hereditarios), o bien en células somáticas (efectos estocásticos somáticos).

En los efectos **deterministas**, el daño se traduce en la muerte de un número sustancial de células, existiendo una dosis umbral por debajo de la cual no tiene lugar efecto determinista alguno. Puesto que el número de células afectadas está en relación con la dosis, en este tipo

de efectos la gravedad resulta proporcional a la dosis recibida, a diferencia de lo que ocurre con los efectos estocásticos.

En esta memoria, únicamente se han abordado los efectos deterministas de las radiaciones ionizantes sobre el sistema hematopoyético.

### **1.2.1. Daño hematopoyético radioinducido**

El sistema hematopoyético es altamente sensible a la radiación por ser un sistema con alto potencial proliferativo, al tener que reemplazar diariamente un gran número de células maduras. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el daño producido por la radiación sobre el sistema hematopoyético va a depender tanto de la radiosensibilidad inherente a las células consideradas individualmente, como de la sensibilidad del tejido, considerado en su conjunto.

#### **1.2.1.1. Radiosensibilidad de células hematopoyéticas**

La radiosensibilidad celular va a verse afectada por diversos factores biológicos, físicos y químicos (Hall, 1988). En relación con los **factores biológicos**, cabe destacar que la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula, va a condicionar el que sea más o menos radiosensible. En términos generales, las células son más radiosensibles en las fases  $G_2$  y  $M$ , menos sensibles en fase  $G_1$  y más radorresistentes en fase  $S$  o  $G_0$  (Sinclair y Morton, 1966; Denenkamp, 1986).

En relación a los **factores físicos**, los más destacados son la calidad de la radiación y la tasa de dosis. La irradiación a una misma dosis pero con distintas LET (transferencia lineal de energía), produce distintos daños en el material biológico. Así, los neutrones son unas 3 veces más dañinos que los rayos X. Por otro lado, tasas de dosis bajas son menos eficaces en cuanto a la producción de lesiones que las tasas de dosis altas.

Por último, en cuanto a los **factores químicos** que influyen en la radiosensibilidad celular, hay dos grandes grupos, radiosensibilizadores y radioprotectores, que como su nombre indica aumentan o disminuyen respectivamente el efecto letal de una dosis dada de radiación.

Para establecer la radiosensibilidad de las células, se determina la muerte celular provocada tras la irradiación, construyéndose las curvas de supervivencia correspondientes en función de la dosis de radiación. De estas curvas se obtiene el valor de  $D_0$ , que se define como la dosis de radiación necesaria para reducir la supervivencia de la población al 37% en la zona exponencial de la curva (Elkind, 1977). El parámetro  $D_0$  es el que se utiliza para comparar la radiosensibilidad de distintas poblaciones celulares.

Desde hace tres décadas, cuando Till y McCulloch determinaron por primera vez la radiosensibilidad de las CFU-S (Till y McCulloch, 1961; 1963) se han realizado numerosas determinaciones de la  $D_0$  de distintos precursores hematopoyéticos y en condiciones experimentales muy distintas (Hendry y Lord, 1983) (Tabla III).

Precursor hematopoyético	$D_0$ (Gy)	Referencia
CAFC <sub>28d</sub>	1,4 <sup>b</sup>	Ploemacher y col., 1992
MRA (preCFU-S)	1,2 <sup>a</sup>	Meijne y col., 1991
CFU-S <sub>12d</sub>	0,94 <sup>a</sup>	Meijne y col., 1991
CFU-S <sub>7d</sub>	0,71 <sup>a</sup>	Meijne y col., 1991
CFU-S <sub>9d</sub>	0,77 ± 0,03 <sup>a</sup>	Hendry y Lord, 1983
CFU-S <sub>9d</sub>	1 ± 0,03 <sup>b</sup>	Hendry y Lord, 1983
CFU-Mix	1,44 <sup>a</sup>	Imai y Nakao, 1987
BFU-E	0,74 <sup>a</sup>	Imai y Nakao, 1987
CFU-GM	1,8 <sup>a</sup>	Imai y Nakao, 1987
CFU-E	0,53 <sup>a</sup>	Imai y Nakao, 1987

**Tabla III:** Radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos. <sup>a</sup>Rayos X (200-300 kV), <sup>b</sup>rayos  $\gamma$  (0,6-1 MeV).

Con los datos disponibles en la actualidad, se puede concluir en relación a la radiosensibilidad de células hematopoyéticas que:

- La radiosensibilidad celular no se ve afectada por la cepa de ratón utilizada (Yuhás y Storer, 1969), ni por la tasa de dosis (Hendry y Lord, 1983). Sin embargo, es dependiente del tipo de radiación utilizada (tabla III).
- En función del órgano hematopoyético de origen, la radiosensibilidad de los precursores se ve afectada. Así, las CFU-S procedentes del bazo muestran una radiosensibilidad similar a las CFU-S del fémur ( $D_0 = 1,0$ ), mientras que las CFU-S de hígado fetal son más radorresistentes con valores de  $D_0$  de 1,5 Gy (Hendry y Lord, 1983).
- Si bien se había postulado que los precursores pluripotentes son más sensibles a la radiación cuanto más inmaduros son, los datos de CAFC y MRA ponían de manifiesto que esto no era así, siendo los precursores más próximos a la célula madre menos sensibles de lo esperado (Tabla III). (Meijne y col., 1991; Ploemacher y col., 1992; Van Os y col., 1993).

- Las células del estroma hematopoyético son más resistentes a la radiación que los precursores hematopoyéticos. Las CFU-F, unidad formadora de colonias de fibroblastos, el único representante del estroma que es clonable, muestran valores de  $D_0$  de 2,2-2,6 Gy (Hendry y Lord, 1983; Imai y Nakao, 1987). Además, la radiosensibilidad de precursores CFU-F varía según la tasa de dosis utilizada, al contrario de lo observado en precursores hematopoyéticos (Hendry y col., 1984).

#### 1.2.1.2. Radiosensibilidad del tejido hematopoyético: síndrome de la médula ósea

Los distintos precursores hematopoyéticos tienen una radiosensibilidad muy elevada, lo que convierte al sistema hematopoyético en un tejido muy sensible a las radiaciones ionizantes. Así, tras la exposición a dosis moderadas de radiación, del orden de 1-10 Gy, tiene lugar una aplasia parcial o total del tejido hematopoyético, provocándose lo que se conoce como **síndrome de la médula ósea o síndrome hematopoyético**, el cual produce la muerte del individuo en 2-6 semanas (Butturini y col., 1988; Hall, 1988; UNSCEAR, 1988).

El síndrome de la médula ósea se caracteriza por un daño a nivel del compartimento de células madre y precursores hematopoyéticos, que va a conducir en último término a un descenso en el número de células maduras en sangre periférica, lo que se conoce como **pancitopenia** y que va a ser causa fundamental de la muerte del individuo.

El brusco descenso en el contenido de leucocitos tras la irradiación (**leucopenia**), conduce a una disminución o falta de resistencia ante procesos infecciosos, así como a un descenso en la producción de anticuerpos y a la ausencia de barreras protectoras (piel, intestino, pulmones), causas que favorecen la aparición de infecciones oportunistas. Por otra parte, la disminución del número de plaquetas (**trombopenia o plaquetopenia**), indispensables para la coagulación sanguínea, lleva asociada una marcada tendencia a las hemorragias, que sumado a la falta de producción de nuevas células de la serie roja puede provocar una grave **anemia**. Si no se consigue remitir estos síntomas a tiempo, se produce la muerte del individuo irradiado. La dosis para producir el 50% de mortalidad en 30 días (LD50/30) está entre 2,5-6,0 Gy, para especies de gran tamaño, entre las que cabe destacar la especie humana. Para ratones y ratas la LD50/30 generalmente es mayor: 6-9 Gy.

#### 1.2.2. Recuperación hematopoyética espontánea después de una irradiación

Ya se ha mencionado en el apartado anterior, que como consecuencia de la exposición a radiaciones ionizantes, el sistema hematopoyético va a sufrir un daño, cuya gravedad va a ser proporcional a la dosis de radiación recibida. Sin embargo, siempre que la irradiación no suponga la desaparición de todas las células madre hematopoyéticas, va a tener lugar una

recuperación espontánea del sistema.

En relación con los precursores CFU-S, se ha descrito que tras una irradiación moderada, la población de CFU-S superviviente comienza tras 24 ó 48 horas a repoblar su compartimento, con un tiempo medio de duplicación de 28 horas en el fémur y de 16 horas en el bazo para radiaciones superiores a 3 Gy (Lajtha y col., 1971), siendo mayor el tiempo medio de duplicación a medida que desciende la dosis de radiación. El tiempo medio de duplicación de 28 horas es similar al que poseen las CFU-S no irradiadas, transplantadas a un receptor primario y probablemente representa el valor óptimo de duplicación para situaciones de reconstitución hematopoyética.

Después de la fase de recuperación, algunos autores han mostrado que las CFU-S alcanzan valores próximos al control, sin que existan evidencias de daño residual en la CFU-S tras la irradiación (Guzman y Lajtha, 1970). A este respecto, existen opiniones contradictorias ya que algunos autores han descrito que las CFU-S, 30 días después de una irradiación, se encuentran por debajo de los valores control (Grande y col., 1990). Así mismo, Croizat y col. describieron que las CFU-S tras una irradiación tenían menor capacidad para regenerar la hematopoyesis de ratones receptores (Croizat y col., 1970).

Se han descrito numerosas curvas de recuperación para los distintos precursores hematopoyéticos en función de la dosis de radiación utilizada en el ensayo (Guzman y Lajtha, 1970; Testa y col., 1974; Hendry y Lord, 1983; Imai y Nakao, 1987; Grande y col., 1990).

Imai y Nakao propusieron una clasificación de los distintos precursores hematopoyéticos de médula ósea según el modelo de recuperación a una dosis de 3,0 Gy (Imai y Nakao, 1987). Un grupo estaría formado por las CFU-Mix, BFU-E y CFU-S<sub>10d</sub>, las cuales muestran una recuperación muy lenta que no alcanza los valores control hasta casi los 30 días. Las CFU-E muestran la caída más severa inmediatamente después de la irradiación, recuperándose ya a los 5 días post-irradiación. Otro grupo sería el formado por los precursores más radiorresistentes CFU-GM y CFU-F, los cuales caen más gradualmente, recuperándose entre los 10-14 días después de la irradiación.

En bazo, los patrones de recuperación son diferentes a los observados en la médula ósea. Varios días después de una irradiación subletal (4,5 Gy), los valores de CFU-GM en bazo se encuentran un orden de magnitud por encima de las CFU-S, y en el día 17 post-irradiación los niveles son superiores a los controles, si bien vuelven lentamente a los valores control en días posteriores (Testa y col., 1974).

Los niveles de células maduras en sangre periférica se van a ver muy disminuidos por efecto de las radiaciones ionizantes. La mayor parte de linfocitos son muy radiosensibles, observándose descensos incluso con dosis moderadas de rayos X, siendo el tiempo de



recuperación función de la dosis de radiación. Las plaquetas con una vida media de 4 días (Odell y col., 1961) sufren una caída muy importante después de la irradiación, alcanzando el valor mínimo sobre el día 10 post-irradiación.

### **1.2.3. Moléculas con capacidad para favorecer la recuperación hematopoyética después de una irradiación**

Si bien el sistema hematopoyético posee capacidad de recuperación espontánea tras la exposición a radiaciones ionizantes, en ocasiones esta recuperación es lenta y no se puede evitar que tenga lugar la muerte del individuo. Además, en determinados tratamientos antitumorales es necesario intensificar la dosis de radiación para aumentar la eficacia del tratamiento, lo que conlleva a un fuerte daño del sistema hematopoyético. Ambas situaciones, han hecho necesario desarrollar toda una serie de terapias que permitan acelerar y/o mejorar la recuperación del sistema hematopoyético tras la irradiación.

Una de las primeras terapias de apoyo utilizadas consistió en **transfusiones de sangre**. Los resultados con estas terapias no han sido satisfactorios para el caso de granulocitos, aunque resultan temporalmente eficaces para eritrocitos y plaquetas.

Otro tipo de terapia es el **trasplante de médula ósea alogénico**, aunque por su complejidad y agresividad puede no resultar siempre el más adecuado a aplicar. Hay que tener en cuenta los riesgos de rechazo injerto contra huesped y las limitaciones de encontrar un donante compatible (Blume, 1986).

Con el **trasplante autólogo de médula ósea** (Gale y Reisner, 1988) o **de células madre periféricas** (DeMagalhaes-Silverman y col., 1993; Henon, 1993), parte de las limitaciones del trasplante alogénico se han solucionado, pero son terapias que no se pueden aplicar en el caso de accidentes radiológicos.

Como se ha comentado previamente, las células madre no son tan radiosensibles como se había descrito inicialmente (Meijne y col., 1991; Ploemacher y col., 1992; Van Os y col., 1993) y además, la supervivencia de un número bajo de células madre es suficiente para que tenga lugar la recuperación completa del sistema hematopoyético (Dick y col., 1985; Keller y col., 1985; Lemischka y col., 1986; Williams y col., 1986). Por ello, se pensó que una buena terapia de apoyo sería la administración de compuestos que aceleraran y mejoraran la recuperación hematopoyética a partir de las células del individuo que hubieran sobrevivido a la irradiación, tanto en tratamientos de radioterapia como en el caso de accidentes radiológicos. Ésto ha conducido a que se hayan descrito un elevado número de moléculas de naturaleza muy diversa, capaces de estimular y/o proteger al sistema hematopoyético frente a una irradiación externa.

Debido al elevado número de compuestos descritos hasta el momento, resultaría interminable describirlos todos. En este apartado, se pretende dar una visión de aquellos compuestos que por su naturaleza química, relacionada con los polisacáridos, o por su papel fisiológico en la hematopoyesis, tienen una especial relevancia en nuestro estudio.

#### **1.2.3.1. Factores hematopoyéticos**

El hecho de que los factores hematopoyéticos estimulen la proliferación de precursores hematopoyéticos *in vitro* e *in vivo*, ha despertado un gran interés en cuanto a su potencial aplicación para acelerar la recuperación hematopoyética después de tratamientos mielosupresores.

La mayoría de los factores hematopoyéticos han sido clonados, por lo que en la actualidad se dispone de ellos en forma recombinante, permitiendo su estudio exhaustivo tanto *in vitro* como *in vivo*, en animales de experimentación (ratones, perros, primates no humanos, etc), y en clínica, en pacientes sometidos a tratamientos antitumorales (Testa y Dexter, 1989; Glaspy y Golde, 1990; Moore, 1991) o en determinados accidentes radiológicos como el de Goiana en Brasil (Butturini y col., 1988; Gale y Butturini, 1990).

El **factor estimulador de colonias granulo-macrofágicas, GM-CSF**, no posee una fuerte actividad radioprotectora. Cuando se administra 1 día antes ó 1 día después de una irradiación potencialmente letal, es capaz de aumentar la supervivencia de los animales al 20% con respecto a un 0% en los controles irradiados (Waddick y col., 1991). En ratones subletalmente irradiados, el tratamiento con GM-CSF inmediatamente después de la irradiación, no es capaz de acelerar la recuperación de precursores hematopoyéticos (Talmadge y col., 1989).

Sin embargo, se ha demostrado tanto en animales de experimentación como en humanos, que el GM-CSF es capaz de reducir el período de neutropenia que sigue a tratamientos de radioterapia, lo que disminuye el riesgo de aparición de infecciones oportunistas (Mayer y col., 1987; Vadhan-Raj y col., 1987; 1990). El GM-CSF no sólo es capaz de aumentar los niveles de neutrófilos, sino que incrementa los valores de monocitos y eosinófilos en pacientes con síndrome mielodisplásico, anemia aplásica y SIDA (Groopman y col., 1987; Vadhan-Raj, 1987; Clark, 1988; Champlin y col., 1989; Glaspy y Golde, 1990; Groopman, 1990). También ha sido aplicado en pacientes sometidos a trasplante autólogo de médula ósea, acelerando la recuperación hematopoyética en estos pacientes (Nemunaitis y col., 1988).

En el accidente radiológico de Goiania (Brasil), 8 víctimas se trataron con GM-CSF mostrando una mejor recuperación de granulocitos, disminuyéndose el período de granulocitopenia (Butturini y col., 1988; Gale y Butturini, 1990).

El **factor estimulador de colonias de granulocitos, G-CSF**, es un potente radioprotector. En ratones sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, este factor hematopoyético provoca el máximo aumento en la supervivencia cuando es administrado 24h y 30 min antes de la irradiación (1.000  $\mu\text{g/kg}$ ), con valores de supervivencia del 62% frente a un 0% de supervivencia en los controles (Uckun y col., 1990; Waddick y col., 1991).

El tratamiento con G-CSF también provoca una recuperación hematopoyética más rápida en ratones sometidos a una irradiación subletal. Esta recuperación se pone de manifiesto a nivel de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como a nivel de precursores hematopoyéticos pluripotentes y comprometidos de la médula ósea (Patchen y col., 1990; Tanikawa y col., 1990).

En clínica, el G-CSF ha sido utilizado en todos aquellos casos en los que era necesaria una recuperación rápida de neutrófilos, observándose reducciones en los períodos de neutropenia en pacientes que habían recibido tratamientos severos de quimioterapia, en enfermos con neutropenia congénita, leucemia, síndromes mielodisplásicos y SIDA (Masaoka y col., 1989; Hestdal y col., 1990; Negrin y col., 1990).

El **factor estimulador de colonias de macrófagos, M-CSF**, ha sido el factor menos estudiado en cuanto a su actividad radioprotectora, quizás debido a que incluso a dosis bajas muestra cierta toxicidad, con aparición de fiebre y otros efectos secundarios no deseados, que limitan tremendamente su aplicación (Whetton y Dexter, 1989). En pacientes sometidos a quimioterapia o con neutropenia crónica, el tratamiento con M-CSF produce un incremento transitorio y de pequeña magnitud en el número de neutrófilos (Motoyoshi y col., 1986; Komiyama y col., 1988).

La **interleuquina-1, IL-1**, es uno de los radioprotectores más potentes descritos hasta el momento. El tratamiento con 0,25 mg/kg de IL-1 protege a los ratones sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, provocando un fuerte aumento en la supervivencia de estos animales (100% frente al 0% en los controles) cuando el tratamiento se realiza 20 horas antes de la irradiación (Neta y col., 1986; Wu y col., 1989; Constine y col., 1991). En ratones subletalmente irradiados, el tratamiento con IL-1 acelera la recuperación de CFU-GM, BFU-E y CFU-Meg en la médula ósea (Schwartz y col., 1987; 1988).

La supervivencia de ratones irradiados con una dosis potencialmente letal disminuía cuando se trataban previamente con un anticuerpo contra uno de los receptores de la IL-1 (Neta y col., 1990). Por otro lado, ese anticuerpo también bloqueaba el efecto radioprotector de la IL-1, así como la producción de factores hematopoyéticos inducida por este factor hematopoyético. Estos datos ponen de manifiesto la relevancia de la IL-1 en la radioprotec-

ción endógena de ratones (Neta y col., 1987; 1990). Zucali y col. han demostrado que la IL-1 ejerce su efecto radioprotector protegiendo células con capacidad de repoblación, tanto a corto, como a largo plazo (Zucali y col., 1994).

El tratamiento con IL-1 lleva asociado una serie de efectos secundarios no deseados que han dificultado tremendamente su utilización en clínica. Estos efectos han podido eliminarse en el nonapéptido sintético derivado de la IL-1 (Frasca y col., 1991). Este nonapéptido sintético, es capaz de aumentar la supervivencia de animales sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, si bien su efecto es menor que el de la IL-1 nativa.

La **interleuquina-3, IL-3**, administrada a ratones irradiados con dosis potencialmente letales no incrementa la supervivencia (Neta y Oppenheim, 1988). Sin embargo, en ratones sometidos a dosis subletales de radiación, incrementa de forma significativa los niveles de precursores hematopoyéticos (Neta y Oppenheim, 1988). Estudios clínicos apuntan a que la IL-3 es capaz de estimular la mielopoyesis, trombopoyesis y en menor grado la eritropoyesis en pacientes con mielosupresión medular (Ganser y col., 1990).

La **interleuquina-6, IL-6**, no aumenta la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales, pero cuando se administra a ratones subletalmente irradiados es capaz de estimular la recuperación hematopoyética. Dosis de 1.000  $\mu\text{g/kg/día}$  de IL-6 durante 6 días aceleran la recuperación de precursores CFU-S, CFU-GM y CFU-E en médula ósea y bazo, así como la recuperación de leucocitos, eritrocitos y plaquetas en sangre periférica (Patchen y col., 1991). Dosis más bajas de IL-6 (10  $\mu\text{g/kg/día}$ ) inhiben la recuperación hematopoyética tras irradiación, disminuyendo los números de precursores en los ratones subletalmente irradiados, e incluso reducen la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales (Pojda y col., 1992).

La producción de IL-6 se ve estimulada tras el tratamiento con IL-1 o TNF (Neta y col., 1988b; McIntosh y col., 1989), habiéndose demostrado que la IL-6 tiene una importante contribución a la resistencia natural al daño radioinducido y también en la recuperación tras irradiación inducida por IL-1 y TNF (Neta y col., 1992).

El **stem cell factor, SCF**, también muestra capacidad radioprotectora en ratones irradiados con dosis potencialmente letales, incrementando de manera significativa la supervivencia de estos animales. El máximo efecto (100% de supervivencia frente al 0% en los controles) se obtiene cuando se administran 3 dosis de SCF (100  $\mu\text{g/kg}$ ) 20 y 2 h antes y 4 h después de la irradiación (Zsebo y col., 1992). En estos animales se ha observado una recuperación acelerada en el contenido de células maduras en sangre periférica, así como de precursores

hematopoyéticos en médula ósea. En ratones irradiados con dosis subletales, el tratamiento con SCF durante 17 días consecutivos (200  $\mu\text{g/kg/día}$ ) estimula la recuperación hematopoyética a nivel de CFU-S, CFU-GM, leucocitos y plaquetas (Patchen y col., 1994). Neta y col., han demostrado recientemente que el SCF es un factor crítico para la recuperación hematopoyética después de una irradiación (Neta y col., 1993).

El **factor de necrosis tumoral, TNF**, es capaz de aumentar la supervivencia hasta un 55% en ratones sometidos a dosis potencialmente letales de radiación cuando se administra 20 horas antes de la irradiación a dosis de 5-10  $\mu\text{g/ratón}$ , frente a un 8% de supervivencia en el control (Neta y col., 1988a). A nivel de recuperación hematopoyética tras una irradiación subletal, el tratamiento con TNF antes de la irradiación, acelera la recuperación del compartimento de células maduras (plaquetas, eritrocitos y leucocitos) y de precursores hematopoyéticos (Slordal y col., 1989). Debido a la alta toxicidad asociada a este compuesto, no se ha llegado a utilizar en ensayos clínicos. Al igual que la IL-1, IL-6 y SCF, el tratamiento con anticuerpos antiTNF produce un descenso en la supervivencia tras dosis potencialmente letales de radiación, lo que sugiere un papel importante de este factor hematopoyético en la radioprotección endógena de ratones (Neta y col., 1991).

#### 1.2.3.2. Polisacáridos y compuestos asociados

Los polisacáridos y otras moléculas que tienen en su composición una parte oligosacáridica (glicoproteínas, lipopolisacáridos, etc) ocupan un lugar importante dentro de la familia de compuestos con capacidad radioprotectora.

El **lipopolisacárido o endotoxina bacteriana (LPS)** es un agente inmunoestimulador e inflamatorio, cuyos efectos *in vivo* están mediados fundamentalmente por la inducción de factores hematopoyéticos, como la IL-1 y el TNF (Beutler y col., 1985; Neta y col., 1991). La inmunización pasiva de animales con anticuerpos antiTNF evita la liberación de IL-1 e IL-6 y a su vez, reduce la mortalidad en situaciones de endotoxemia inducida por LPS (Fong y col., 1989).

Una de las primeras actividades descritas para el LPS fue su capacidad radioprotectora, descrita ya en 1953 por Mefferd y col., los cuales mostraron que el tiempo que sobrevivían los ratones después de una irradiación se veía aumentado por el tratamiento previo con Piromén, un pirógeno bacteriano de naturaleza lipopolisacáridica (Mefferd y col., 1953). Estudios posteriores mostraron que la endotoxina de tipo Boivin, procedente de *Proteus morganii*, administrada 24 h antes de la irradiación era capaz de aumentar de manera significativa la supervivencia. El grado de radioprotección dependía del tiempo en el que se inyectaba la endotoxina respecto a la irradiación, así como de la dosis de radiación utilizada

(Ainsworth y Hatch, 1958; 1960). Como norma general, el LPS era más eficaz si se administraba antes de la irradiación, sin embargo, se observó cierta radioprotección cuando se administró hasta 24 h después de la irradiación. El rango de dosis activas para el LPS es específico para cada tipo de LPS, siendo en este caso de 100 µg/kg (Ainsworth y Hatch, 1960).

La aplicación clínica del LPS se ha visto dificultada por los efectos secundarios no deseados asociados con el tratamiento con este compuesto (Sparks y col., 1973).

Los **muramil dipéptidos** (MDPs) producen numerosos efectos fisiológicos semejantes a los producidos por endotoxinas u otros polisacáridos de origen microbiano: modulación de mielopoyesis (Galelli y Chedid, 1983), estimulación de precursores hematopoyéticos (Wuest y Wachsmuth, 1982; Broudy y col., 1990) y estimulación de resistencia inespecífica a infecciones (Eppstein y col., 1986).

Un análogo sintético del MDP, el muramil tripéptido fosfatidil-etanolamina lipofílico (MTP-PE), ha sido encapsulado en liposomas MLV (vesículas multilamelares) para reducir su toxicidad y dirigirlo a monocitos/macrófagos (Fidler, 1985; 1986; Schumann y col., 1989). Cuando es administrado 24 h antes de la irradiación produce un aumento de la supervivencia del 85% frente a un 16% en los controles. En animales sometidos a irradiación subletal, el tratamiento con MTP-PE acelera la recuperación hematopoyética en médula ósea a nivel de celularidad y precursores hematopoyéticos (Federocko, 1994).

Se ha postulado que el efecto radioprotector del MTP-PE-MLV está mediado por la producción de factores hematopoyéticos que producirían una rápida recuperación hematopoyética tras irradiación (Schwartz y col., 1987; Morrissey y col., 1988; Schwartz, 1989; Slordal y col., 1989). Además, este compuesto es capaz de aumentar el número de precursores en fase-S, haciéndolos más radorresistentes, lo que contribuiría a su actividad radioprotectora (Federocko, 1994).

Los **poliglicanos** son polisacáridos compuestos por subunidades de carbohidratos: fructosa, glucosa o manosa. Dentro de este grupo, los más estudiados han sido los glucanos, tanto en su forma soluble (**glucano-F**) como en su forma particulada (**glucano-P**), aislados de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos muestran actividades biológicas muy semejantes, si bien la forma soluble tiene la ventaja frente a la particulada de que su administración no produce efectos secundarios de tipo hepatoesplenomegalia o formación de granulomas (Deiman y Fahimi, 1980).

En ratones sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, la administración de 60

mg/kg antes de la irradiación de glucano-P ó F produce aumentos significativos de la supervivencia: 53% y 60% respectivamente, frente a un 0% de supervivencia en ratones control (Patchen y McVittie, 1986b). El tratamiento con glucano-P y glucano-F potencia la recuperación de leucocitos, plaquetas y hematocrito en sangre periférica de ratones subletalmente irradiados (Patchen y McVittie, 1985). Además, se ha descrito que el glucano aumenta la resistencia del huesped frente a infecciones oportunistas, incluso antes de que se pueda detectar regeneración hematopoyética significativa, lo que ha llevado a postular que el aumento de resistencia frente a infecciones más que deberse al efecto del glucano sobre el sistema hematopoyético, es consecuencia de la capacidad de este compuesto para aumentar y/o prolongar la función macrofágica. Asimismo, existen evidencias de que el glucano pueda actuar como un efectivo captador de radicales libres, lo que explicaría su capacidad radioprotectora (Patchen y col., 1987).

Cuando se compara la capacidad del glucano para estimular la recuperación hematopoyética en ratones subletalmente irradiados, con la mostrada por otros polisacáridos de tipo fructanos o mananos, se pone de manifiesto que el glucano es el que posee el mayor efecto (Patchen y col., 1984).

El **AM5**, principio activo del *inmunoferon* (AM3), es un complejo polisacárido-proteína (glucomanano fosforilado de 150 kDa obtenido de la pared celular de *Candida utilis*) aislado y purificado por A. Guerrero y J.P. Pivel (Industrial Farmacéutica Cantabria S.A.). El AM5 ha mostrado ser un potente radioprotector y estimulador de la hematopoyesis en ratón (Real, 1991).

Al igual que con la mayoría de los compuestos descritos hasta el momento, la actividad radioprotectora del AM5 es dependiente del momento en que se realice el tratamiento en relación a la irradiación. El tratamiento con AM5 1 día antes de la irradiación aumenta la supervivencia al 90% en animales sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, siendo ésta en el lote control del 10% (Real y col., 1992). Además, este tratamiento con AM5 aminora la caída de los niveles de leucocitos y eritrocitos post-irradiación, acelerando la recuperación hematopoyética tras una irradiación potencialmente letal. Así mismo, el AM5 posee capacidad para estimular precursores hematopoyéticos en ratones sometidos a dosis subletales de radiación (Real y col., 1992).

El AM5 ejerce su efecto radioprotector mediante la estimulación de la recuperación hematopoyética post-irradiación. Diversas evidencias sugieren que los diferentes efectos asociados con el AM5 están mediados por factores hematopoyéticos como la IL-1, SCF y M-CSF (Güenechea y col., 1994; 1995).

En la actualidad, la administración de factores hematopoyéticos de forma individual es la terapia de apoyo más ampliamente utilizada, habiéndose obtenido resultados esperanzadores. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que son numerosos los estudios que han demostrado que la administración simultánea de varios factores es la que reporta mejores respuestas del sistema hematopoyético (Quesenberry, 1986; Broxmeyer y Williams, 1988; Neta y col., 1988a; Curtis y col., 1991; McNiece y col., 1991; Broxmeyer, 1992).

Así, aquellos compuestos que induzcan la liberación endógena de varios factores hematopoyéticos, supondrían una alternativa a la administración de dichos factores, con toda una serie de ventajas asociadas como es en primer término el costo del tratamiento respecto a una terapia con múltiples factores. De hecho, existen toda una serie de moléculas de diversa naturaleza que ejercen su acción sobre el sistema hematopoyético a través de la inducción de liberación endógena de factores (King y col., 1992; McGrath y col., 1992; Pelus y col., 1994; Güenechea y col., 1995).

En el trabajo presentado en esta memoria se ha abordado la problemática de la mielosupresión inducida por radiaciones ionizantes, centrándose en la potencialidad de tres moléculas polisacarídicas para revertir o aminorar dicha mielosupresión en el modelo animal de ratón. Así mismo, se han intentado clarificar los mecanismos de acción de los polisacáridos propuestos, tanto a nivel de caracterización de los diversos efectos inducidos por estos compuestos, como a nivel molecular, estudiando los posibles mediadores de su efecto.



## **OBJETIVOS**

El objetivo principal en esta tesis ha sido evaluar la capacidad radioprotectora de tres moléculas de naturaleza polisacáridica, AM218, AM250 y AM251, en situaciones de síndrome hematopoyético, así como profundizar en los mecanismos de acción de dichas moléculas.

Para alcanzar este objetivo se han realizado diversas aproximaciones experimentales que permiten obtener información sobre distintos aspectos relacionados con las dosis activas, órganos hematopoyéticos implicados, pautas de administración efectivas, etc, lo que se ha concretado en los siguientes objetivos parciales:

- Caracterizar el efecto estimulador de los polisacáridos propuestos sobre el sistema hematopoyético de ratones no mielosuprimidos.
- Evaluar la capacidad de los polisacáridos seleccionados para favorecer la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales, con una atención especial a la influencia de la pauta de administración de los polisacáridos.
- Profundizar en los mecanismos de radioprotección de los polisacáridos arriba mencionados, determinando:
  - La capacidad para acelerar la recuperación hematopoyética en ratones expuestos a radiaciones ionizantes.
  - El efecto sobre la sensibilidad de precursores hematopoyéticos frente a la radiación.
- Determinar si dichos polisacáridos tienen capacidad de inducir la producción de factores hematopoyéticos.

La consecución de los objetivos parciales arriba mencionados con los tres polisacáridos estudiados permitiría, no sólo caracterizar en detalle sus efectos sobre el sistema hematopoyético en relación con su capacidad radioprotectora, sino también determinar las implicaciones de los factores hematopoyéticos en dichos efectos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. POLISACÁRIDOS

En base a datos de la bibliografía, en la que numerosos compuestos de naturaleza polisacáridica se han descrito como moduladores del sistema hematopoyético (apartado 1.2.3.2.), y en función de la amplia experiencia de Industrial Farmacéutica Cantabria S.A. en la química de este tipo de compuestos y del CIEMAT en el estudio del sistema hematopoyético, se llevó a cabo un plan concertado coordinado CDTI (nº 890058) denominado: "Estudio y desarrollo de polisacáridos como agentes activadores de recuperación hematopoyética", cuyo objetivo final era la selección de una molécula de naturaleza polisacáridica activa como recuperador hematopoyético.

Para ello se realizó un estudio sistemático incluyendo diferentes niveles de *screening*. Tanto la elección de los polisacáridos "cabeza de serie" como el primer nivel de *screening*, se realizó por el Departamento de Investigación de Industrial Farmacéutica Cantabria S.A.. Los polisacáridos "cabeza de serie" fueron elegidos considerando su origen biológico y su estructura, procurando abarcar el mayor número de variables: homopolímeros no derivatizados lineales y ramificados, homopolímeros derivatizados, heteropolímeros, etc.

Se eligieron 30 polisacáridos "cabeza de serie" que pasaron al primer nivel de *screening* establecido (Real, 1991): análisis del contenido de precursores granulo-macrofágicos (CFU-GM) en bazo y médula ósea de ratón, 5 días después del tratamiento por vía *i.v.* con dosis de 60 mg/kg o menores, dependiendo de la dosis máxima tolerada para cada polisacárido determinada previamente. Asimismo, se cuantificaron los niveles de endotoxina o LPS presentes en los productos para descartar la posibilidad de que el efecto estimulador observado fuera consecuencia de una contaminación con LPS de las muestras, ya que este compuesto está descrito como un potente estimulador hematopoyético (Ainsworth y Hatch, 1958; 1960). En este primer nivel de *screening*, 15 polisacáridos mostraron actividad estimuladora sobre el sistema hematopoyético murino.

En base a su índice terapéutico y a otras consideraciones industriales, se eligieron 3 compuestos pertenecientes a la misma familia de polisacáridos polianiónicos con diferencias en cuanto al porcentaje y distribución de los residuos a lo largo de la cadena polisacáridica. Los 3 polisacáridos seleccionados tienen un alto peso molecular, alrededor de 200 kDa, determinado por SEC/HPLC/RI, y muestran un patrón de distribución unimodal. Con estos 3 compuestos, codificados como AM218, AM250 y AM251 se han realizado los estudios que se presentan en esta memoria. Para su utilización, los tres polisacáridos se disolvieron en agua desionizada a una concentración máxima de 6 mg/ml.

## 3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

### 3.2.1. Animales de experimentación

Los animales utilizados han sido ratones de la especie *Mus musculus* de la cepa híbrida B6CF1 resultado del cruce de hembra C57BL/6J con macho BALB/c. Dichas cepas proceden de laboratorios Jackson (Bar Harbor, USA) y se crían en el estabulario de la Unidad de Biología Molecular y Celular del Instituto de Medio Ambiente del CIEMAT (nº registro 28079-21A).

Los ratones fueron mantenidos a 22°C de temperatura ambiente, 50% de humedad relativa, fotoperíodo de luz/oscuridad de 12 horas, con agua y pienso Sandermus (Sanders) *ad libitum*.

La edad de los ratones utilizados en los diferentes ensayos era de 11-13 semanas, excepto cuando se utilizaron como donadores para la realización de cultivos de larga duración de médula ósea (8 semanas de edad) o como receptores para el ensayo *in vivo* de la CFU-S (12-24 semanas de edad).

La manipulación de los ratones se ha llevado a cabo de acuerdo a las normas establecidas en el Convenio Europeo (Estrasburgo, 18-3-1986) y en el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos.

### 3.2.2. Suspensiones celulares de órganos hematopoyéticos

Para la obtención de las distintas suspensiones celulares, los animales fueron sacrificados, previa anestesia, mediante dislocación cervical. Los distintos órganos hematopoyéticos, médula ósea o bazo, se extrajeron en condiciones asépticas. Los órganos fueron homogeneizados en medio IMDM<sup>1</sup> (Gibco Life technologies). El número de células nucleadas de la suspensión, previamente diluida en líquido Turk<sup>2</sup> para lisar células no nucleadas, fue determinado por recuento en cámara de Neubauer. Toda la manipulación de las suspensiones celulares se hizo a temperatura ambiente y en cabina de flujo laminar.

---

<sup>1</sup> medio Dulbecco modificado por Iscove suplementado con 20 µg/ml de asparagina, 75 U/ml de sulfato de estreptomicina, 75 µg/ml de penicilina-G y tamponado con 3,02 g/l de bicarbonato sódico.

<sup>2</sup> ácido acético al 2% (v/v) y azul de metileno al 0,01% (v/v).

### 3.2.2.1. Suspensión celular de médula ósea

Una vez sacrificados los ratones se extrajeron sus fémures y tibias. La médula ósea se obtuvo perfundiendo los huesos con medio IMDM, utilizando jeringas de 1 ml con agujas de 0,5x16 mm. Al pasar la suspensión por dicho tamaño de aguja se consigue la dispersión de posibles agregados celulares.

### 3.2.2.2. Suspensión celular de bazo

Los bazos fueron extraídos quirúrgicamente y sumergidos en medio de cultivo. Posteriormente y con un homogeneizador *Potter*, se disgregaron los bazos hasta dejar sólo la cubierta conectiva de los mismos. Tras desechar los fragmentos más grandes de dicha cubierta por decantación, se disgregó la suspensión pasándola a través de una aguja de 0,5x16 mm, como en el caso de la médula ósea.

### 3.2.2.3. Extracción de sangre periférica. Obtención de suero

Para el conteo de células maduras la sangre se extrajo de una de las venas laterales de la cola del ratón, recogién dose aproximadamente 100  $\mu$ l sin necesidad de sacrificar al ratón. La sangre se mantuvo con EDTA 10 mM o heparina al 1% libre de conservantes (Lab. LEO, S.A.), con lo que se evitaba su coagulación.

Para la obtención de suero, una vez extraída la sangre de la vena subaxilar del ratón (sin EDTA o heparina), se dejó coagular a 37°C durante 1-2 horas y se mantuvo a 4°C, al menos 4 horas más, para permitir la retracción del coágulo. Posteriormente se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos en microcentrífuga (Eppendorf), se recogió el suero y se congeló a -20°C hasta su utilización.

### 3.2.3. Líneas celulares establecidas

Se han utilizado distintas líneas celulares establecidas como controles positivos de la expresión de factores hematopoyéticos y en otros casos, para producir medio condicionado. En la tabla IV se resumen las propiedades y métodos de cultivo de las distintas líneas celulares utilizadas.

Para obtener medio condicionado de la línea WEHI-3b, las células se diluyeron a la concentración de  $10^5$  células/ml en medio suplementado con 5% de FBS (v/v), recogién dose el sobrenadante cuando se alcanzaba la concentración de  $10^6$  células/ml (aproximadamente 3-7 días después).

Los cultivos de las diferentes líneas celulares se mantuvieron en frascos de cultivo (Nunc) a 37°C, en atmósfera de 95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. En el caso de líneas celulares adherentes, al llegar las células a la confluencia,  $\sim 1\text{-}3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> dependiendo del tipo de línea, fueron tripsinizadas (tripsina-EDTA<sup>3</sup>) y cultivadas a una dilución adecuada.

LÍNEA Y SU-MINISTRO	ORIGEN	UTILIZACIÓN	MEDIO DE CULTIVO	REFERENCIA
<b>C127I</b> ECACC (90060504) <sup>4</sup>	tumor mamario	control expresión SCF	DMEM <sup>5</sup> + 10% FBS	Tushinski y col., 1991
<b>EL-4</b> ECACC (85022105Est)	linfoma T	control expresión GM-CSF, G-CSF, IL-6, TNF $\alpha$	DMEM + 10% FBS	McGrath y col., 1992
<b>L929</b> ECACC (85011425)	tejido conectivo	control expresión M-CSF	IMDM + 10% FBS	Ladner y col., 1988
<b>NIH 3T3</b> ATCC (CRL 1658)	embrión de ratón Swiss	control expresión SCF	DMEM + 10% FBS	Anderson y col., 1990; Huang y col., 1990
<b>P388.D<sub>1</sub></b> Industrial Farmacéutica Cantabria S.A.	mielomonocíticas	control expresión IL-1 $\alpha$	DMEM + 10% FBS	Mizel y Mizel, 1981; Rennick y col., 1987
<b>WEHI-3b</b> ECACC (86013003)	mielomonocíticas	control expresión IL-3 y producción de medio condicionado	McCoy's <sup>6</sup> + 10% FBS	Dexter y col., 1980; Eliason y col., 1988

**Tabla IV:** Líneas celulares

<sup>3</sup> 500  $\mu$ g/ml de tripsina, 220  $\mu$ g/ml de EDTA, 160  $\mu$ g/ml de glucosa, rojo fenol al 3% en PBS 1x que es NaCl 137 mM, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM.

<sup>4</sup> referencia en la colección europea (ECACC) o americana (ATCC) de líneas celulares.

<sup>5</sup> medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco Life technologies) suplementado con L-glutamina 4,2x10<sup>-3</sup> M, 75 U/ml de sulfato de estreptomicina, 75  $\mu$ g/ml de penicilina-G y tamponado con 3,70 g/l de bicarbonato sódico.

<sup>6</sup> medio McCoy's (Gibco Life technologies) suplementado con 75 U/ml de sulfato de estreptomicina, 75  $\mu$ g/ml de penicilina-G y tamponado con 2,20 g/l de bicarbonato sódico.

### 3.3. CUANTIFICACIÓN DE PRECURSORES Y CÉLULAS MADURAS HEMATOPOYÉTICAS

#### 3.3.1. Ensayo de precursores hematopoyéticos pluripotentes

El ensayo de CFU-S, unidad formadora de colonias exógenas en bazo, se realizó siguiendo el método descrito por Till y McCulloch (1961). Este cultivo se realiza *in vivo*, mediante el trasplante de una suspensión de células hematopoyéticas en ratones receptores sometidos a una dosis de radiación potencialmente letal que suprime su sistema hematopoyético (figura 6). En nuestro laboratorio, la dosis de radiación utilizada fue de 10 Gy, suministrados en 2 fracciones de 5 Gy con un intervalo de 4 horas entre una y otra. Con esta dosis se consigue la no aparición de colonias endógenas producidas por el sistema hematopoyético del ratón receptor, asegurando a su vez un 90% de supervivencia de los ratones durante el ensayo.

La edad de los ratones receptores fue de 12-24 semanas. Datos del laboratorio habían demostrado que la edad de los ratones receptores no influye en la eficiencia del ensayo (Maganto, 1985).

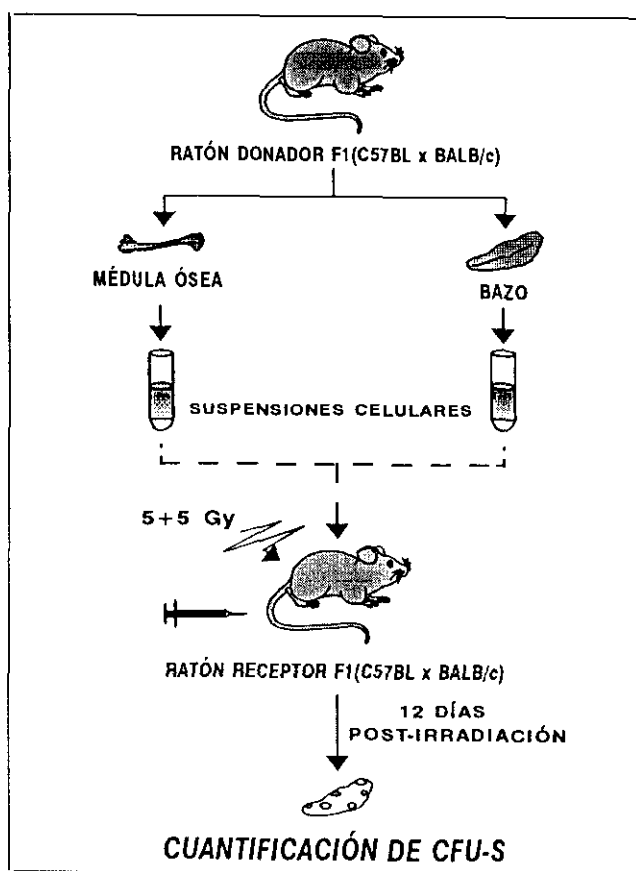


Figura 6: Ensayo de formación de colonias exógenas en bazo, CFU-S<sub>12d</sub>.



En un período de tiempo no superior a 4-6 horas post-irradiación, un número de células hematopoyéticas apropiado para la formación de 10-15 colonias por bazo fue inyectado *i.v.* a los ratones irradiados en un volumen de 0,2 ml en IMDM. Al cabo de 12 días se extrajo el bazo a los ratones receptores, en cuya superficie se podían apreciar a simple vista nódulos redondeados u ovals, resultado cada uno de ellos de la proliferación de un precursor CFU-S (Magli y col., 1982). Los bazos fueron fijados en solución Telly<sup>7</sup>, tomando las colonias un color blanquecino sobre el fondo marrón oscuro del bazo (figura 6). Las colonias fueron contadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico SMZ2 (Nikon).

### **3.3.2. Ensayo de precursores hematopoyéticos comprometidos**

Se han utilizado técnicas de cultivo de precursores granulo-macrofágicos (CFU-GM) y eritroides (BFU-E). Para ello, se ha utilizado el crecimiento clonal *in vitro* en matriz semisólida de agar (CFU-GM) o de metilcelulosa (BFU-E).

#### **3.3.2.1. Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas (CFU-GM)**

Los precursores CFU-GM, que dan lugar a colonias de granulocitos y macrófagos, fueron los primeros precursores hematopoyéticos crecidos *in vitro* en un ensayo clonal (Bradley y Metcalf, 1966).

La técnica utilizada para el cultivo de precursores CFU-GM es la que se lleva a cabo de forma rutinaria en el laboratorio (Grande, 1988).

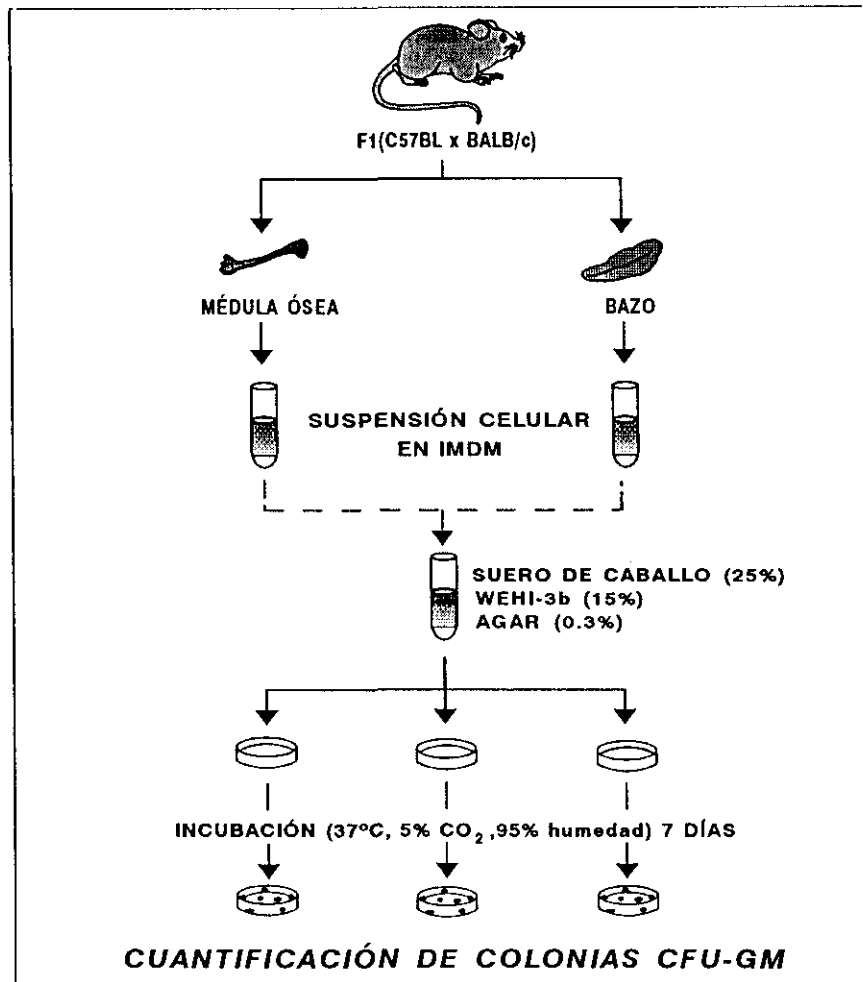
Los cultivos de CFU-GM se realizaron sobre matriz semisólida de agar (Bactoagar, Difco). El medio de cultivo IMDM fue suplementado con 25% (v/v) de suero de caballo (Flow), previamente inactivado (56°C durante 30 minutos) y 15% (v/v) de medio condicionado WEHI-3b como fuente de factores de crecimiento hematopoyético, fundamentalmente IL-3 (Dexter y col., 1980) (figura 7).

A esta mezcla se añadió la suspensión celular preparada en IMDM y por último agar al 5% (0,3% de concentración final). Se sembró 1 ml por placa de cultivo de 35 mm (Nunc), sembrándose 3 placas por lote (figura 7). Con objeto de facilitar la gelificación del agar, las placas se mantuvieron en el frigorífico durante 10 minutos, incubándose posteriormente a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

---

<sup>7</sup> etanol al 44% (v/v), ácido acético al 31% (v/v) y formaldehído al 2,3% (v/v).

Las colonias CFU-GM se contaron tras 7 días de incubación, con ayuda de un microscopio Olympus stereo-zoom. Sólo fueron consideradas colonias aquellas agrupaciones que contaban con más de 50 células.



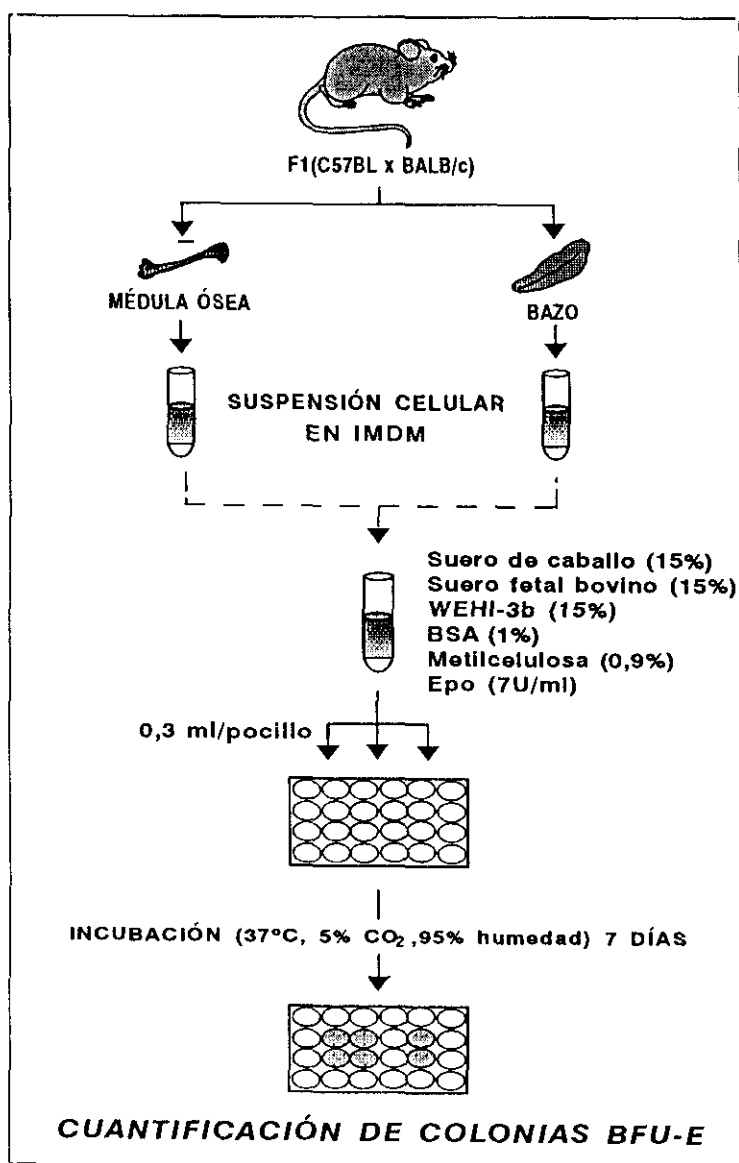
**Figura 7:** Cultivo de precursores granulo-macrofágicos, CFU-GM.

### 3.3.2.2. Unidad formadora de *burst* eritroides (BFU-E)

El protocolo seguido para el cultivo de BFU-E (Segovia y col., 1991) fue una modificación de la técnica descrita previamente (Metcalf y col., 1979; Tejero y col., 1984). El cultivo de BFU-E se realizó sobre matriz semisólida de metilcelulosa (Dow Chemical Co.).

El medio de cultivo preparado para el desarrollo de dichos precursores fue IMDM suplementado con 15% (v/v) de FBS, 15% (v/v) de suero de caballo (previamente inactivados), 1% de seroalbúmina bovina desionizada (Fraction V, Sigma), 15% (v/v) de medio condicionado de la línea WEHI-3b, 7 U/ml de eritropoyetina (Boehringer Mannheim)

y 0,9% de metilcelulosa previamente suplementada<sup>8</sup> (figura 8). A esta mezcla se le añadió la suspensión celular en IMDM, homogeneizándose con la ayuda de una jeringa con aguja de 0,8x40 mm. Con cada mezcla, se sembraron 3 pocillos de una placa de 24 pocillos (Nunc), dispensando 0,3 ml/pocillo (figura 8). Los cultivos fueron incubados a 37°C, con atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. A los 7-8 días, el número de colonias BFU-E fue cuantificado con la ayuda de un microscopio invertido Diaphot-TMD (Nikon) por observación en campo claro.



**Figura 8:** Cultivo de precursores eritroides, BFU-E.

<sup>8</sup> preparada en medio IMDM al 2,5%, suplementándose a una concentración de  $2,5 \times 10^{-5}$  M de  $\alpha$ -tioglicerol (Fluka S.A.),  $4 \times 10^{-4}$  M de L-glutamina (Flow) y  $2 \times 10^{-7}$  M de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma).

### 3.3.3. Cuantificación de células maduras en sangre periférica

La cuantificación de células maduras en sangre periférica se realizó siempre en cámara de Neubauer, de forma individualizada para cada ratón y con ayuda de un microscopio invertido Diaphot-TMD (Nikon):

- Leucocitos. La sangre se diluyó en líquido Turk, el cual lisa los eritrocitos presentes en la muestra, facilitando la cuantificación de leucocitos.
- Eritrocitos. Para su conteo se diluyó la sangre en electrolito Isotón II (IZASA), solución no hemolizante.
- Plaquetas. Para el conteo de plaquetas la sangre se diluyó en una solución de oxalato amónico al 1 % (Brecker y Cronkite, 1950). Posteriormente, la muestra diluida se mantuvo durante media hora en agitación mecánica para hemolizar completamente los eritrocitos.

### 3.4. CULTIVO DE LARGA DURACIÓN DE MÉDULA ÓSEA (LTBMC)

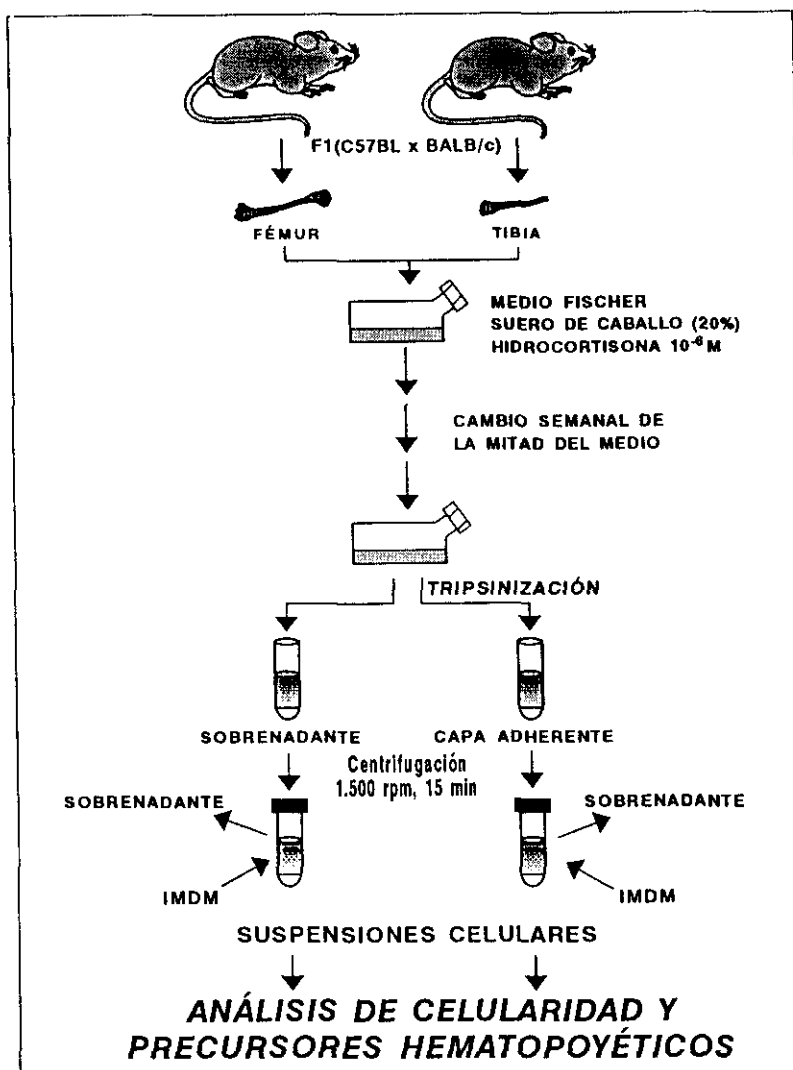
El protocolo de cultivo de larga duración de médula ósea utilizado (Real, 1991) fue una modificación del descrito por Dexter y col. (1977) (figura 9).

Médula procedente de ratones de 8 semanas de edad se perfundió directamente, y sin dispersión posterior, en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) con 10 ml de medio de cultivo Fischer<sup>9</sup> (Gibco Life technologies), 20% (v/v) de suero de caballo previamente inactivado por calor (30 min a 56°C) y hemisuccinato sódico de hidrocortisona 10<sup>-6</sup> M (Sigma). El cultivo se mantuvo a 33°C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Semanalmente se retiró la mitad del medio y se sustituyó por medio fresco. En base a la experiencia del laboratorio en este tipo de cultivos siempre se ha utilizado el mismo lote de suero de caballo, con objeto de asegurar el normal desarrollo del cultivo y la reproducibilidad entre experimentos.

Con las condiciones de cultivo descritas, la celularidad del sobrenadante y capa adherente de los cultivos control se mantenía en un rango de  $8,70 \pm 0,68 \times 10^6$  y  $6,33 \pm 0,70 \times 10^6$  células por frasco respectivamente. Los valores de precursores CFU-GM por frasco, eran de  $20,28 \pm 4,70 \times 10^3$  en el sobrenadante y de  $37,45 \pm 8,50 \times 10^3$  en la capa adherente.

---

<sup>9</sup> suplementado con 200 U/ml de penicilina-G, 200 µg/ml de estreptomicina sulfato y tamponado con 1,12 g/l de bicarbonato sódico.



**Figura 9:** Cultivo de larga duración de médula ósea (LTBMC).

Para la obtención de las suspensiones celulares del LTBMC, se utilizaron al menos 3 frascos por tratamiento. Tras agitar suavemente cada frasco, se procedió a la extracción del sobrenadante con ayuda de una pipeta estéril. Una vez determinada la concentración celular mediante recuento en cámara de Neubauer, la suspensión se centrifugó a 1.500 rpm durante 15 min. Por un lado, se resuspendían las células en IMDM, para posteriormente cuantificar los precursores hematopoyéticos presentes (figura 9). Por otro lado, el sobrenadante libre de células se recogió y congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis de la producción de factores hematopoyéticos mediante ensayos de GM-CSA y ELISA (apartados 3.5.1. y 3.5.3).

Para la cuantificación de precursores hematopoyéticos, la capa adherente de cada frasco se obtuvo mediante la adición de tripsina-EDTA. La tripsinización fue detenida añadiendo medio IMDM suplementado con un 10% (v/v) de suero de caballo. La suspensión así obtenida se pasó a través de una jeringa con aguja (0,5 x 16 mm) para eliminar los agregados celulares,

determinando posteriormente la concentración celular. Al igual que en el caso del sobrenadante, la suspensión celular procedente de la capa adherente de 3 frascos se centrifugó, resuspendiéndose posteriormente las células en medio IMDM (figura 9). Para la extracción de ARN de la capa adherente no se tripsinizaron las células, añadiéndose la solución de lisis directamente sobre la capa adherente (apartado 3.5.2.2).

### 3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE FACTORES HEMATOPOYÉTICOS

#### 3.5.1. Determinación de la presencia de actividad estimuladora de colonias CFU-GM (GM-CSA)

El ensayo tiene su base en el cultivo convencional de CFU-GM en matriz semisólida de agar (Real, 1991). La suspensión celular preparada en medio IMDM, se suplementó con un 25% (v/v) de suero de caballo inactivado. En estos cultivos el medio condicionado de la línea WEHI-3b que aporta los factores de crecimiento hematopoyético necesarios, fue sustituido por el sobrenadante libre de células procedente del LTBMCM a una concentración final del 10 al 30% (v/v) (figura 10). La actividad presente en el sobrenadante es proporcional al número de colonias CFU-GM que crecen en estas condiciones.

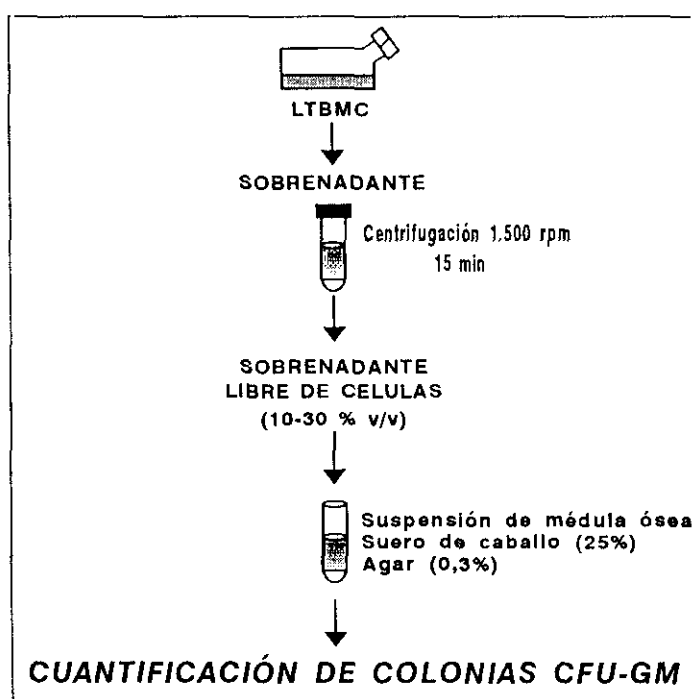


Figura 10: Ensayo de actividad estimuladora de colonias (GM-CSA) en los sobrenadantes de LTBMCM.

### **3.5.2. Análisis de la expresión de factores hematopoyéticos**

#### **3.5.2.1. Sondas de ADN para factores hematopoyéticos**

Para llevar a cabo el análisis de la expresión de factores hematopoyéticos era imprescindible el disponer de una colección de sondas que nos permitiera reconocer el ARN mensajero de los factores hematopoyéticos a estudiar. Nos interesaban sondas en forma de ADN complementario, lo que favorece su especificidad, y que estuviesen clonadas en plásmidos recombinantes ya que ésto nos proporciona una fuente ilimitada de sonda.

Todas las sondas han sido cedidas por otros laboratorios en forma de ADN plasmídico con un gen de resistencia a neomicina, por lo que fue necesario la transformación de bacterias competentes y posterior selección en presencia de ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sambrook y col., 1989). El aislamiento de ADN de los plásmidos se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Posteriormente, tras la digestión del ADN plasmídico con las enzimas de restricción adecuadas, mediante electroforesis en un gel de agarosa se comprobó que los tamaños de los distintos fragmentos de ADN obtenidos correspondían con los descritos por los autores. En caso afirmativo, el fragmento de restricción de ADN clonado se purificó mediante el método de la agarosa caliente (Sambrook y col., 1989).

En *Northern blots* realizados con ARN procedente de las líneas celulares utilizadas como controles positivos de la expresión de cada uno de los factores hematopoyéticos, se comprobó la capacidad de cada sonda para reconocer específicamente el ARN mensajero de los factores. De esta manera se seleccionaron las sondas a utilizar para los distintos factores hematopoyéticos murinos, que consistieron en:

- **G-CSF**, fragmento EcoRI de 1.400 bp, cedido por S. Nagata (Osaka Bioscience Institute, Osaka, Japan) en el plásmido pMG-2 (Tsuchiya y col., 1986).
- **GM-CSF**, fragmento EcoRI-PstI de 700 bp, cedido por E. Stanley (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia) en el plásmido pGM3.2 (Gough y col., 1985).
- **IL-1 $\alpha$** , fragmento EcoRI-HindIII de 420 bp (Lomedico y col., 1984) cedido por P. Vassalli (Université de Genève, Geneve, Suiza) en el plásmido pSP65-IL1.
- **IL-3**, fragmento EcoRI-HindIII de 300 bp (Yokota y col., 1984) cedido por P. Vassalli en el plásmido pSP65-IL3.
- **IL-6**, fragmento EcoRI-BglII de 650 bp (Chiu y col., 1988) cedido por J.C. Gutierrez (Harvard University, Boston, Massachusetts, USA) en el plásmido pIL6/BS.

- **M-CSF**, fragmento EcoRI-HindIII de 1.100 bp (Ladner y col., 1988) cedido por P. Vassalli en el plásmido pSPmM1.
- **SCF**, fragmento EcoRI de 598 bp (Anderson y col., 1990) cedido por Antibióticos Pharmacia, S.A., Madrid, en el plásmido pUC-KL(t).
- **TNF $\alpha$** , fragmento EcoRI-NcoI de 700 bp (Pennica y col., 1985) cedido por P. Vassalli en el plásmido pSP65-mTNFA.
- **Proteína ribosómica 7S**, fragmento BamHI de 200 bp (Balmain y col., 1982) en el plásmido PA6.

El marcaje radiactivo para las sondas de ADN se realizó por el método del iniciador aleatorio (Feinberg y Vogelstein, 1983), utilizando  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol de actividad específica) (Amersham o New England Nuclear) y oligonucleótidos 6-mer (Amersham, Boehringer), obteniendo una actividad específica final de  $1\text{-}2 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g de ADN. Los nucleótidos no incorporados tras la reacción (1 hora, 37°C) fueron retirados por cromatografía en columna de exclusión de sephadex G-50 (Pharmacia) (Sambrook y col., 1989).

### 3.5.2.2. Northern blot

Para extraer ARN total de la capa adherente de LTBMCS y de cultivos de las líneas celulares NIH 3T3, L929, C127I y P388D<sub>1</sub>, se retiró el sobrenadante de los cultivos, la capa adherente se lavó 2 veces con <sup>10</sup>PBS<sup>++</sup>1x y se raspó con 2,5 ml de solución de lisis<sup>11</sup> por frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Las líneas celulares WEHI-3b y EL-4 que crecen en suspensión fueron centrifugadas durante 15 min a 1.500 rpm y la solución de lisis se añadió al precipitado, aproximadamente 10 ml por  $10\text{-}30 \times 10^6$  células.

Para la obtención de ARN a partir de órganos hematopoyéticos primarios, los fémures y tibias se perfundieron con la solución de lisis (1 ml/hueso). Los bazos, una vez diseccionados, se homogeneizaron en 10 ml de solución de lisis.

En la purificación del ARN se utilizó el método AGPC (isotiocianato de guanidinia-fenol-cloroformo ácido), basado en la precipitación selectiva del ARN en frío con isopropanol en

---

<sup>10</sup> NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,9 mM y MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM.

<sup>11</sup> isotiocianato de guanidinia 4 M (Sigma), citrato sódico 25 mM pH 7, sarcosina al 0,5% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M.



presencia de isotiocianato de guanidinia (Chomczynski y Sacchi, 1987), con las siguientes modificaciones: las muestras se homogeneizaron durante 2 min en Ultra-Turrax; tras la obtención del último precipitado se trató con proteinasa K (100  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 1 h a 37°C en acetato sódico 0,3 M pH 6, EDTA 1mM y SDS al 0,1%; se hicieron dos extracciones con fenol-cloroformo equilibrado previamente con el mismo tampón de la proteínasa K y se precipitó con etanol y acetato sódico (Ramírez, 1992). Se comprobó que las muestras de ARN no estaban degradadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando como tampón TBE<sup>12</sup> con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) que permite visualizar los ARN ribosómicos.

El ARN (20 ó 25 $\mu\text{g}$ ) se separó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes con 4,19 g/l de tampón MOPS (Sigma) y formaldehído al 6% (v/v), en geles de agarosa al 1% (SeaKem LE, FMC BioProducts) (Lehrach y col., 1977). La transferencia se hizo por capilaridad durante 16 horas con SSC<sup>13</sup> 20x a un filtro de nylon (*Gene Screen-Plus*; Dupont, New England, Nuclear). Posteriormente el ARN fue fijado al filtro por irradiación durante 2 min con rayos ultravioleta y mantenimiento a 70°C durante 2 horas. Para la localización del ARN ribosómico (ARNr), el filtro se tiñó con azul de metileno (Sambrook y col., 1989).

El filtro que contiene el ARN, se prehibridó durante 1 a 3 horas a 42°C con una solución que contenía Denhardt's 5x<sup>14</sup>, formamida al 50% (v/v), SDS al 1%, SSC 5x y Tris-HCl 10mM pH 7,5. Posteriormente, se hibridó durante 16 horas con la misma solución, a la cual se había añadido un 10% de dextrano sulfatado T500 (Pharmacia), 200  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de esperma de salmón (Boehringer Mannheim) y la sonda marcada, todo ello en estufa de hibridación (Bachofner) a 42°C para todas las sondas, excepto en el caso de las del M-CSF y 7S, en donde la prehibridación e hibridación se realizó a 56°C debido a la gran afinidad de estas dos sondas por su ARN mensajero.

Los filtros se lavaron a 56°C con SDS al 0,5% y SSC 0,1x (3 lavados de 1 hora), para así eliminar toda la marca inespecífica. Cuando la hibridación se realizó con las sondas para el M-CSF y 7S, la temperatura de lavado se elevó a 65°C, lo que evitaba un exceso de marca radiactiva para estas sondas. Una vez lavados los filtros, se expusieron en películas Kodak X-OMAT (Eastman Kodak, Rochester, NY) con pantallas intensificadoras (Cronex lighting, Dupont) a -70°C. El tiempo de exposición variaba en un rango amplio según la sonda

---

<sup>12</sup> TBE es 10 mM de Tris, 10 mM de ácido bórico y 2mM de EDTA.

<sup>13</sup> SSC 1x es NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM.

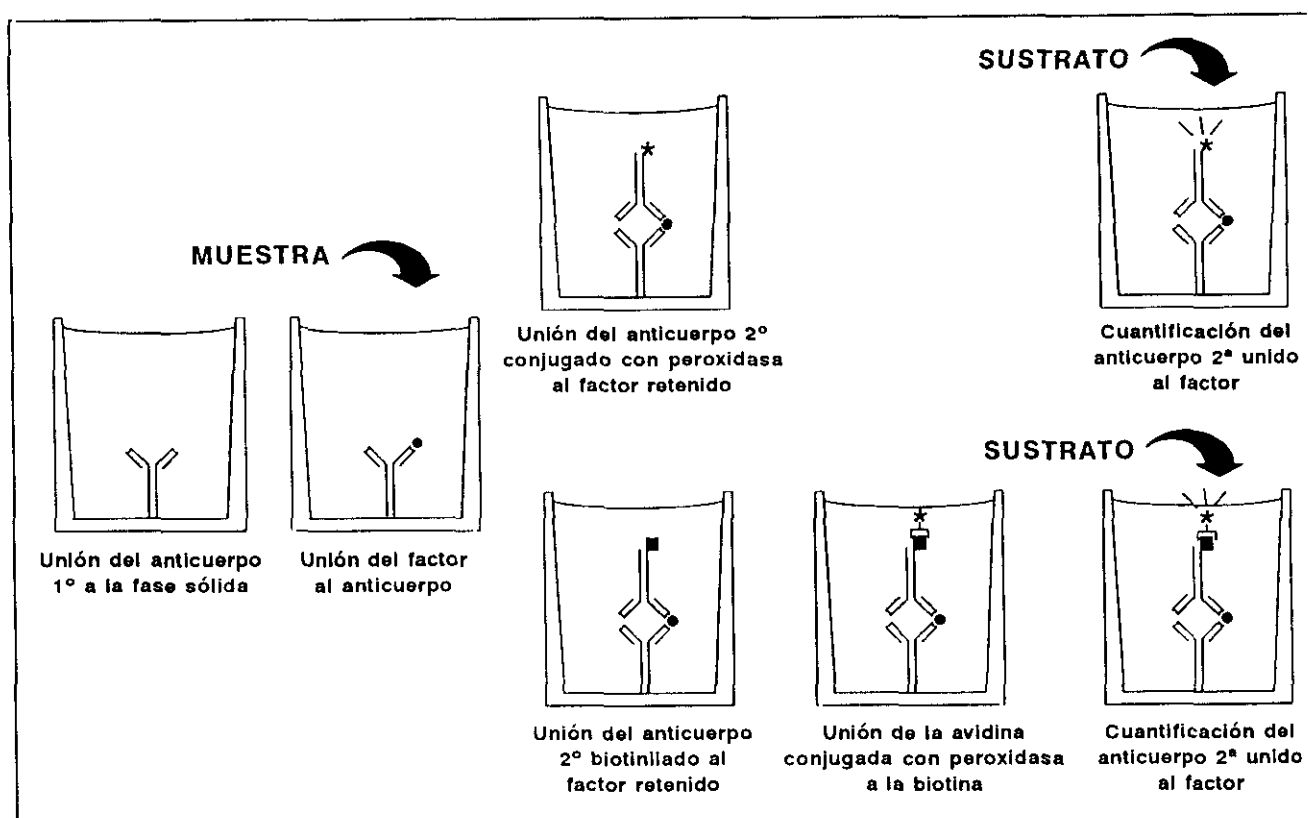
<sup>14</sup> Denhardt's 1x es polivinil-pirrolidona al 0,02%, BSA al 0,02% y Ficoll 400 al 0,02% (v/v).

utilizada, desde aproximadamente 1 hora para la sonda 7S hasta 15-20 días para la sonda de la IL-3.

Los filtros se hibridaron secuencialmente con las sondas mencionadas. Entre una hibridación y la siguiente fue necesario eliminar los restos del ADN hibridado, para lo cual se realizaron 3 lavados de 2 min en SDS al 0,01% y SSC 0,01x a ebullición.

### 3.5.3. Inmunoensayo enzimático, ELISA

Para la detección de factores hematopoyéticos solubles, se han utilizado *kits* comerciales de ELISA.



**Figura 11:** Método ELISA de doble anticuerpo para la cuantificación de factores de crecimiento hematopoyético.

El método ELISA para la detección de factores hematopoyéticos es un inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo (o *tándem*) (figura 11). Así, en placas de 96 pocillos que contienen un anticuerpo monoclonal específico para el factor a analizar, se captura el factor presente en los controles y en las muestras. Después de lavar vigorosamente, se añade el

anticuerpo policlonal secundario (específico para un epítipo distinto del reconocido por el primer anticuerpo) biotinilado o conjugado con peroxidasa. En el caso de utilizar el anticuerpo biotinilado, posteriormente se añade avidina conjugada con peroxidasa que se unirá a los complejos biotinilados capturados en el pocillo. La adición de la solución de sustrato inicia un cambio de color catalizado con peroxidasa (figura 11). La reacción se paró mediante acidificación y los resultados se leyeron a 450 nm en un lector de placas Multiskan Bichromatic (Labsystems).

Con la ayuda del programa Genesis para ensayos en microplacas (Labsystem) se obtuvo la curva de calibración, a partir de la cual se determinaron las concentraciones de factor en las muestras experimentales.

Los *kits* para la detección de GM-CSF, IL-3 e IL-6 (Endogen Inc, Boston, Massachusetts, USA) tienen unos niveles mínimos de detección de proteína biológicamente activa de 5, 3 y 15 pg/ml respectivamente. Para la IL-1 $\alpha$  (Genzyme, Cambridge, Massachusetts, USA), el nivel de detección del *kit* es de 15 pg/ml.

### **3.6. IRRADIACIÓN**

La irradiación se llevó a cabo con un equipo de rayos-X MG324 de Philips, en la instalación radiactiva IR-04 del CIEMAT, siguiendo los criterios y normas de Protección Radiológica que recoge la legislación (Reglamento sobre Instalaciones Nucleares y Radiactivas, 21/7/72; Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes 12/8/82-25/11/87).

La medida de exposición, necesaria para determinar la tasa de dosis absorbida en tejido, se realizó con el dosímetro Farmer 2570 de Nuclear Enterprises y la cámara de ionización de 0,6 cm<sup>3</sup> modelo 2571 de la misma firma. La cámara fue calibrada en el laboratorio de Nuclear Enterprises y posteriormente, en el Laboratorio Oficial de Calibración de la División de Metrología del CIEMAT, a una calidad de 100 KV y capa hemirreductora de 4,03 mm Al. La estabilidad de la cámara se comprobó mensualmente, mediante una fuente de Sr<sup>90</sup> tipo 2503/3 (Nuclear Enterprises).

Para la irradiación global de los ratones, éstos fueron introducidos en recipientes de metacrilato diseñados y construidos para este propósito en el CIEMAT, en grupos no superiores a 25. Durante el período de irradiación el recipiente se encontraba situado en una mesa giratoria, situada a 43 cm del foco de irradiación de 300 kV y 10 mA, consiguiéndose una tasa de dosis uniforme de 1,05 Gy/min, resultando las variaciones de la dosis absorbida en los animales, inferior al 2%. Para suspensiones celulares las condiciones de irradiación fueron de 250 kV y 12,8 mA, consiguiéndose una tasa de dosis uniforme de 0,42 Gy/min.

La filtración inherente nominal del tubo fue de 2,2 mm Be + 3 mm Al y la filtración adicional de 0,4 mm Sn, 0,25 mm Cu y 1 mm Al. La capa hemirreductora (HVL) resultante fue de 3,2 mm Cu.

De forma periódica se realizaron dosimetrías biológicas con objeto de establecer la dosis de radiación óptima para ensayos de CFU-S que permitieran una alta supervivencia de los ratones, y que a su vez evitaran la aparición de colonias endógenas en bazo.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales mostrados en la memoria representan la media entre experimentos. En todos los casos este valor medio va acompañado del error estándar obtenido de al menos 3 experimentos.

Las suspensiones celulares utilizadas en los distintos protocolos experimentales procedían de la médula ósea o bazo de al menos 3 ratones, en el caso de LTBMCS, las suspensiones procedían de 3 frascos/lote.

Para cada suspensión a analizar, en el caso de cultivos de precursores CFU-GM se sembraron 3 placas y en el caso de ensayos de CFU-S se inyectaron de 8 a 10 ratones, haciéndose en cada caso la media de los datos.

La determinación de la existencia o no de diferencias significativas entre los valores de los lotes control y los lotes tratados en los distintos experimentos se realizó mediante el test estadístico *t* de *Student*. Dicho método es válido para muestras de pequeño tamaño, como las utilizadas en este trabajo.

A partir del valor de *t* se calculó el nivel de significación (*p*), estableciéndose el criterio:

Significativo:  $p < 0,05$  (\*)

No significativo:  $p > 0,05$

En los ensayos de supervivencia se utilizaron 10 animales por lote, obteniéndose los porcentajes de supervivencia con al menos 30 animales. Los porcentajes de supervivencia se compararon entre grupos con la prueba chi-cuadrado incluyendo la corrección de *Yates*. En este caso, el nivel de significación se calculó a partir del valor de  $\chi^2$ , estableciéndose la significación cuando  $p < 0,05$  (\*).

## **RESULTADOS**

El trabajo presentado en esta memoria se ha centrado en el análisis de la capacidad de moléculas de naturaleza polisacáridica para actuar sobre el sistema hematopoyético, lo que les conferiría una potencial aplicación como terapia de apoyo en situaciones de mielosupresión producidas por las radiaciones ionizantes. Las terapias de apoyo desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de víctimas de accidentes radiológicos al mejorar la recuperación del sistema hematopoyético y en tratamientos antitumorales al permitir una intensificación del tratamiento, y por tanto mejorar su eficacia.

Los primeros estudios realizados en esta tesis fueron encaminados a determinar los efectos provocados por los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre el sistema hematopoyético de ratón, comenzando por la caracterización de su efecto estimulador sobre la hematopoyesis esplénica y medular de ratones no mielosuprimidos. Una vez demostrada la capacidad de estos polisacáridos para estimular el sistema hematopoyético en condiciones normales, se caracterizó su capacidad radioprotectora en animales mielosuprimidos como consecuencia de la exposición a radiaciones ionizantes, a dosis tanto potencialmente letales como subletales.

Posteriormente y con objeto de caracterizar los posibles mecanismos de acción de dichos polisacáridos sobre el sistema hematopoyético, se abordaron diversos ensayos para cuantificar la respuesta de diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas, así como para establecer los mediadores de dichos efectos.

#### **4.1. CAPACIDAD DE LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251 PARA ESTIMULAR Y/O RADIOPROTEGER EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE RATÓN**

A la hora de realizar el diseño experimental para abordar el estudio de los efectos de un producto sobre el sistema hematopoyético, se hace imprescindible acotar el número de variables que intervienen. Para ello, nos hemos basado tanto en la experiencia adquirida en el laboratorio durante años, como en datos recogidos en la bibliografía sobre moléculas de naturaleza similar a las estudiadas en este trabajo (Patchen y McVittie, 1983; Patchen y McVittie, 1986a; Real, 1991; Real y col., 1992; Güenechea y col., 1995).

En relación a estas variables cabe destacar la vía de administración del polisacárido, dosificación y rango de dosis activa que no lleve asociado toxicidad. Otras variables asociadas al ensayo que se realiza serán comentadas en los apartados de resultados correspondientes.

- Vía de administración del polisacárido. La vía de administración va a condicionar de manera decisiva la dosis de producto a administrar, no sólo en términos de toxicidad sino también en relación a la dosis efectiva. La elección de una u otra vía de administración, va

a venir condicionada por las características físico-químicas del compuesto: solubilidad, peso molecular, estabilidad, vida media, forma galénica, etc. Las vías de administración más utilizadas son: *intravenosa (i.v.)*, *intraperitoneal (i.p.)*, *subcutánea (s.c.)* u *oral (p.o.)*.

Cada una de estas vías de administración presenta ventajas y desventajas en base fundamentalmente a la magnitud del efecto que van a producir y a la toxicidad que llevan asociadas. En el caso de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, por su naturaleza soluble y por datos previos del laboratorio, se seleccionó la vía de administración *i.v.*.

- Dosificación del polisacárido. Dependiendo de la actividad del compuesto, así como de su vida media en el organismo, surge en muchos casos la necesidad de administrar varias dosis del compuesto para obtener efecto. Sin embargo, tanto resultados obtenidos en el laboratorio con moléculas de naturaleza polisacárido-proteína, como datos recogidos en la literatura, sugieren que los compuestos de naturaleza polisacarídica son activos tras la administración de una dosis, por lo que los polisacáridos empleados en estos estudios fueron administrados en dosis únicas (Ainsworth y Hatch, 1960; Patchen y MacVittie, 1986a; Maisin y col., 1986; Real y col., 1992).
- Dosis del polisacárido. El principal problema asociado con la dosis a administrar es la toxicidad que ésta pueda llevar asociada. El rango de dosis de los diferentes polisacáridos que no mostraba problemas de toxicidad fue determinado por Industrial Farmacéutica Cantabria S.A., utilizando tanto sistemas *in vivo* como *in vitro*. El rango de dosis a administrar *in vivo* fue de 20-100 mg/kg e *in vitro* de 50-250 µg/ml.

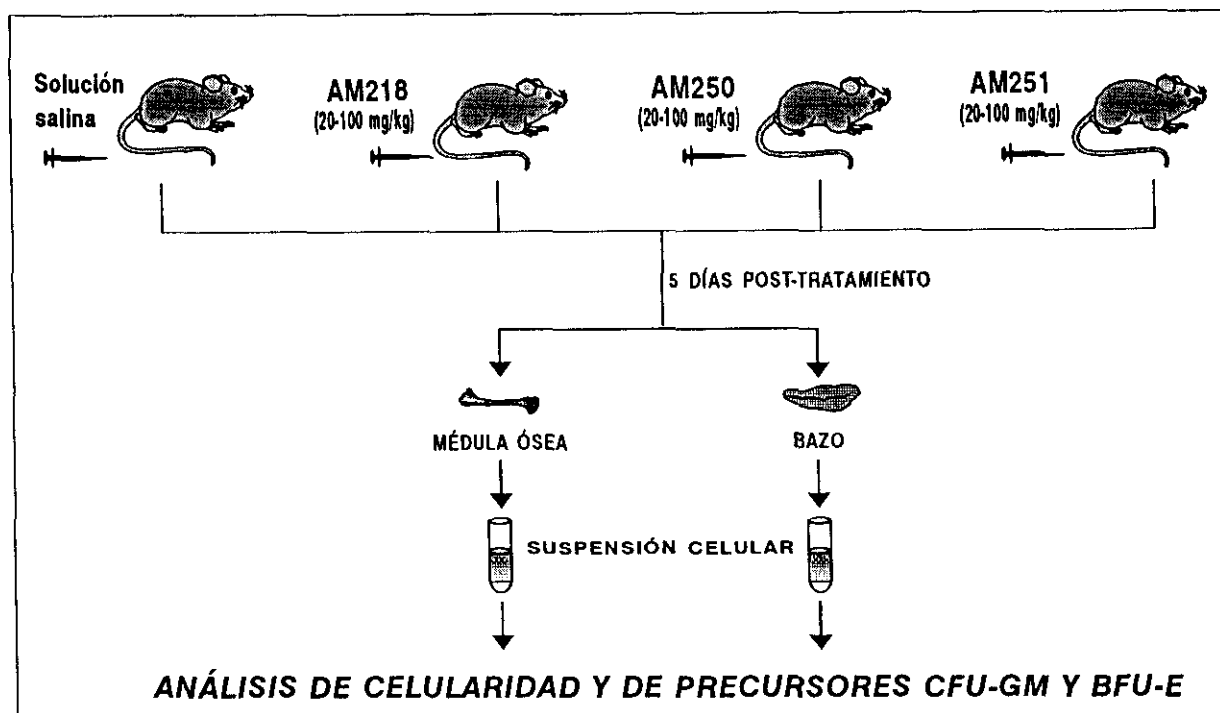
#### **4.1.1. Efecto de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre la hematopoyesis de ratones normales**

Una vez decididas la vía y protocolo de administración, así como el rango de dosis de los polisacáridos a analizar, los primeros análisis fueron encaminados a caracterizar y cuantificar el efecto estimulador de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre el sistema hematopoyético de ratones normales, es decir, ratones cuyo sistema hematopoyético está intacto. Esta aproximación presenta la ventaja de su simplicidad frente a ensayos realizados con ratones irradiados, si bien hay que tener en cuenta que la estricta regulación a la que está sometido el sistema hematopoyético en condiciones normales puede conllevar un menor efecto asociado al tratamiento con estos polisacáridos.

Para caracterizar el efecto de los distintos polisacáridos sobre el sistema hematopoyético de ratones normales, se determinó la estimulación inducida por dichos polisacáridos sobre el compartimento de precursores hematopoyéticos comprometidos, tanto hacia la línea granulomacrofágica (CFU-GM) como hacia la línea eritroide (BFU-E). La cuantificación de

precursores se llevó a cabo 5 días después de la administración del polisacárido, ya que resultados previos del laboratorio y de la literatura señalaban este día como apropiado para detectar el efecto asociado al tratamiento (Patchen y McVittie, 1985; Real y col., 1992).

El protocolo experimental seguido en estos estudios se muestra en la figura 12. Los polisacáridos objeto del estudio, AM218, AM250 y AM251, se inyectaron *i.v.* a ratones normales en forma de dosis únicas de 20, 40, 60, 80 ó 100 mg/kg. Cinco días después del tratamiento se cuantificaron la celularidad y contenido de precursores hematopoyéticos comprometidos en la médula ósea y en el bazo. En paralelo se analizaron los mismos parámetros en un lote de ratones control inyectados con solución salina.



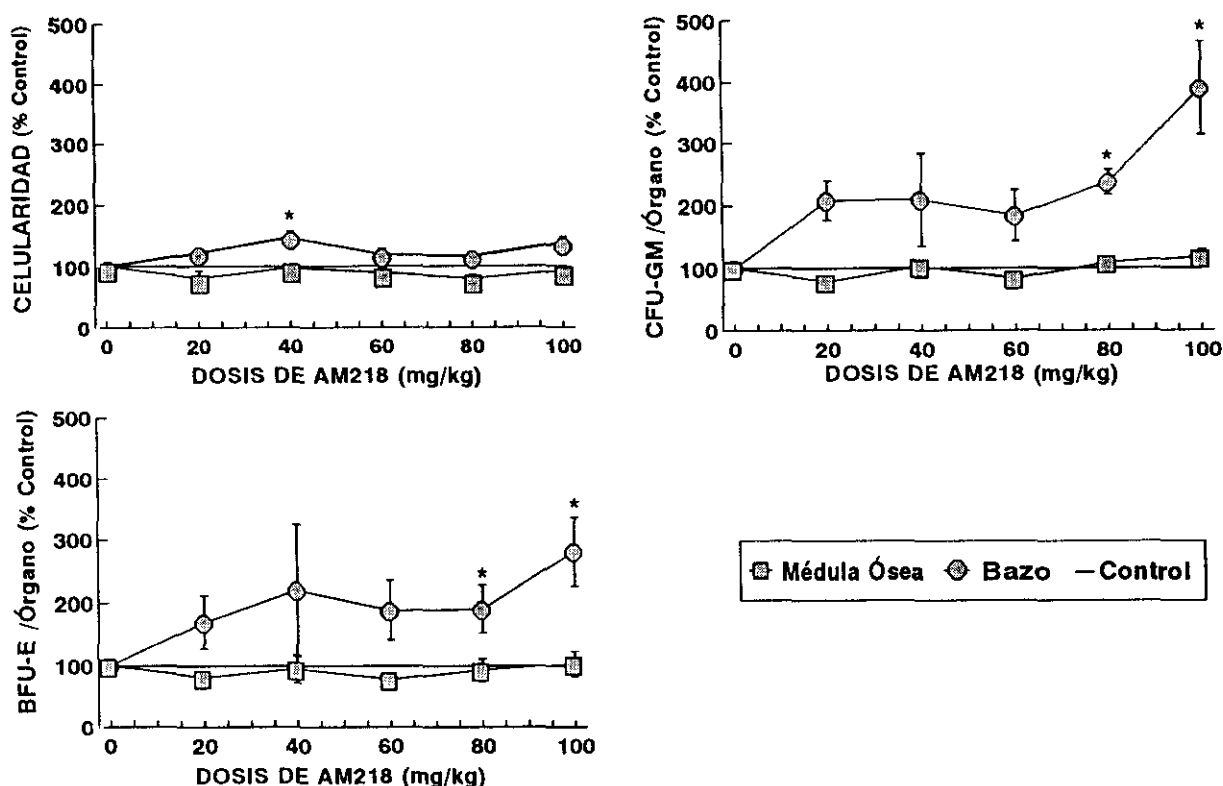
**Figura 12:** Esquema del protocolo utilizado para el estudio del efecto del tratamiento con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre el sistema hematopoyético de ratones normales.

El tratamiento con **AM218** no produjo variaciones significativas en la celularidad ni en los niveles de precursores CFU-GM o BFU-E de la médula ósea, en el rango de dosis de polisacárido ensayado (figura 13).

El efecto del AM218 sobre la celularidad del bazo fue leve y únicamente ratones tratados con 40 mg/kg de AM218 mostraron diferencias en la celularidad esplénica frente al control (aumento de 1,5 veces respecto a la celularidad control) (figura 13). El tratamiento con dosis altas de AM218 (80-100 mg/kg) provocó un incremento significativo respecto al control en



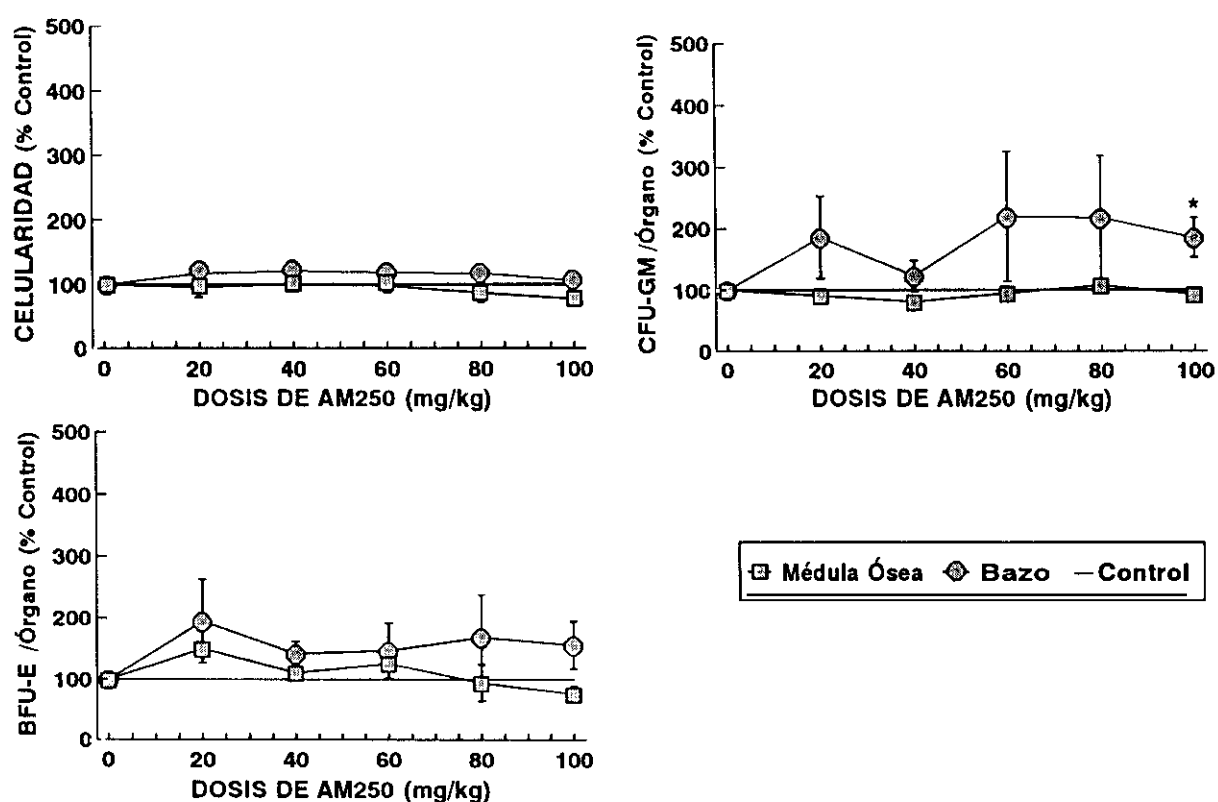
el contenido de precursores CFU-GM y BFU-E, incremento que fue máximo con dosis de 100 mg/kg de polisacárido (aumento de 4,0 y 3,0 veces en CFU-GM y BFU-E respectivamente). Dosis de 60 mg/kg o inferiores no provocaron cambios significativos en el contenido de precursores comprometidos en bazo.



**Figura 13:** Efecto del tratamiento con distintas dosis del polisacárido AM218 sobre la celularidad y contenido de precursores CFU-GM y BFU-E en médula ósea y bazo. \*p < 0,05. Valores control en fémur:  $16,90 \pm 1,11 \times 10^6$  células;  $33,21 \pm 1,67 \times 10^3$  CFU-GM;  $6,24 \pm 0,55 \times 10^3$  BFU-E; y en bazo:  $207,90 \pm 8,27 \times 10^6$  células;  $5,10 \pm 0,59 \times 10^3$  CFU-GM;  $3,30 \pm 0,31 \times 10^3$  BFU-E.

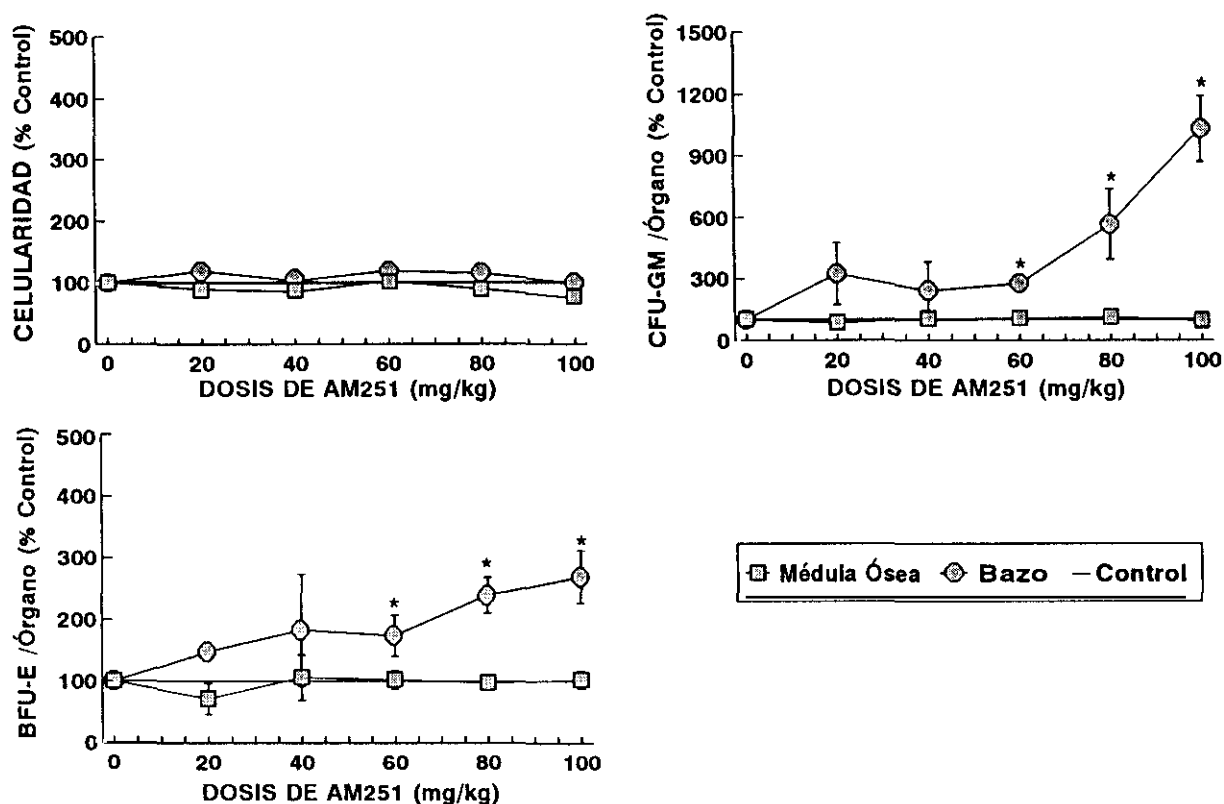
En ratones tratados con AM250, si bien se observó estimulación de la hematopoyesis esplénica, dicha estimulación fue menor a la observada con el AM218 (figura 14). Así, sólo aquellos ratones que habían sido tratados con 100 mg/kg de AM250 mostraron valores de CFU-GM en bazo significativamente superiores a los controles (incremento de 1,8 veces). Con ninguna de las dosis de AM250 ensayadas se observaron aumentos significativos en los niveles de BFU-E o de celularidad en el bazo (figura 14).

Como en el caso del AM218, no se detectó efecto sobre la hematopoyesis de la médula ósea tras el tratamiento con AM250 en ninguno de los parámetros ensayados (celularidad, CFU-GM y BFU-E) y con ninguna de las dosis administradas (figura 14).



**Figura 14:** Efecto del tratamiento con distintas dosis del polisacárido **AM250** sobre la celularidad y contenido de precursores CFU-GM y BFU-E en médula ósea y bazo. \* $p < 0,05$ . Valores control en pie de figura 13.

La estimulación hematopoyética en bazo provocada por el tratamiento con **AM251** fue superior a la observada anteriormente con **AM218** ó **AM250** a nivel de precursores CFU-GM (figura 15), observándose incrementos de 10 veces respecto al control en el bazo de ratones tratados con 100 mg/kg de **AM251**. A nivel de precursores BFU-E, los ratones tratados con **AM251** mostraron incrementos muy similares a los descritos con **AM218** (aumentos de 3,0 veces respecto al control) (figura 15). Al igual que en los casos anteriores, la hematopoyesis medular no se vio afectada por el tratamiento con **AM251**.



**Figura 15:** Efecto del tratamiento con distintas dosis del polisacárido AM251 sobre la celularidad y contenido de precursores CFU-GM y BFU-E en médula ósea y bazo. \* $p < 0,05$ . Valores control en pie de figura 13.

Estos resultados muestran que el tratamiento *in vivo* con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 produce una estimulación de la hematopoyesis esplénica en ratones normales. Sin embargo, no se observó estimulación hematopoyética en la médula ósea, independientemente del polisacárido analizado o de la dosis utilizada.

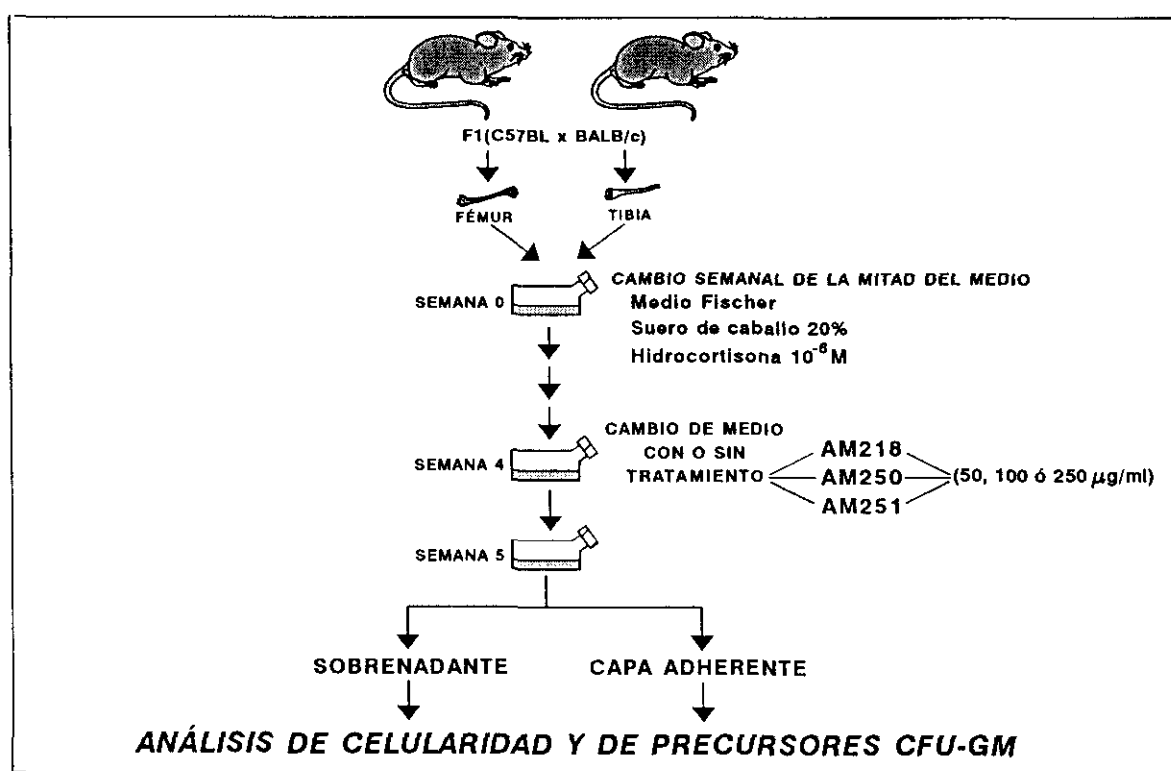
#### 4.1.2. Actividad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre la hematopoyesis *in vitro*, en cultivos de larga duración de médula ósea de ratón (LTBMCs)

El hecho de no detectar estimulación de hematopoyesis medular *in vivo*, no descartaba el que los polisacáridos estudiados actuaran sobre este órgano, pero que debido a fenómenos de migración de precursores desde la médula ósea, dicha estimulación no se pudiera detectar (Real y col, 1992).

Con objeto de comprobar si estos polisacáridos eran capaces de estimular la hematopoyesis medular, se analizó su efecto sobre cultivos de larga duración de médula ósea (LTBMCs). El LTBMC permite reproducir *in vitro* la hematopoyesis que tiene lugar *in vivo*. Así, en un

frasco de cultivo tienen lugar fenómenos de proliferación y diferenciación hematopoyética de manera similar a los que ocurren en la médula. Además, al ser el LTBMK un sistema cerrado no existe la posibilidad de que tengan lugar fenómenos de migración de precursores que puedan enmascarar el efecto estimulador del polisacárido.

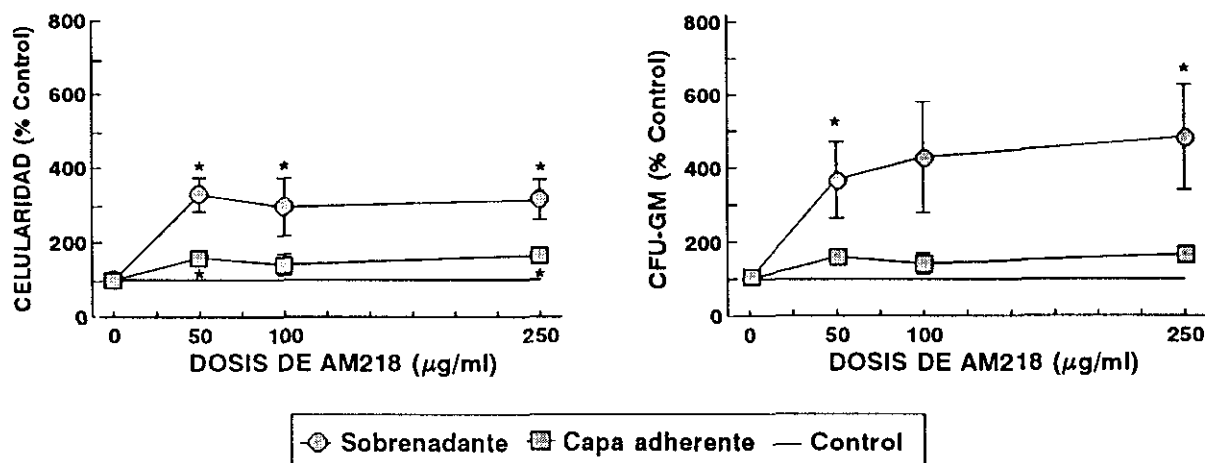
El protocolo experimental seguido en estos estudios se muestra en la figura 16. Cuatro semanas después de iniciarse el cultivo, se realizó el tratamiento con los polisacáridos coincidiendo con el cambio de medio. En esa semana, el cultivo ya estaba perfectamente desarrollado, con una capa adherida al fondo del frasco formada por las diferentes células que componen el estroma hematopoyético necesario para mantener la hematopoyesis por largos períodos de tiempo. Las dosis administradas *in vitro*, fueron de 50, 100 y 250  $\mu\text{g/ml}$ . Una semana después del tratamiento, se cuantificó tanto la celularidad, como el contenido de precursores hematopoyéticos comprometidos (CFU-GM), en el sobrenadante y capa adherente de los cultivos (Real, 1991).



**Figura 16:** Esquema del protocolo utilizado para el estudio del efecto de la administración *in vitro* de AM218, AM250 y AM251 sobre la hematopoyesis de cultivos de larga duración de médula ósea (LTBMK).

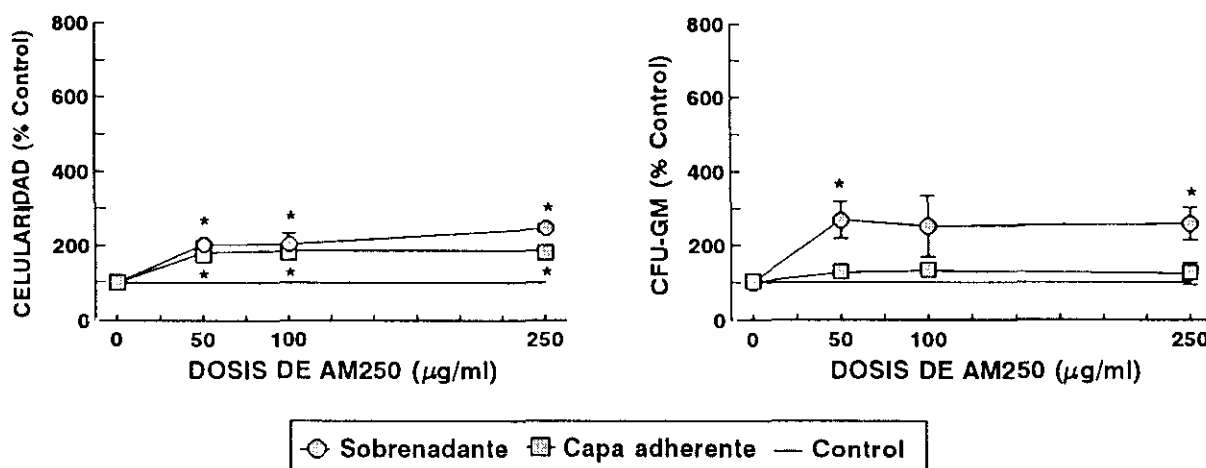
El tratamiento con **AM218** produjo un aumento en la celularidad del sobrenadante y capa adherente respecto al control de 3,0 y 1,6 veces respectivamente (figura 17). En relación al contenido de precursores CFU-GM, en el sobrenadante se obtuvieron aumentos de hasta 5,0

veces respecto al control, mientras que en la capa adherente no se observaron variaciones significativas (figura 17).



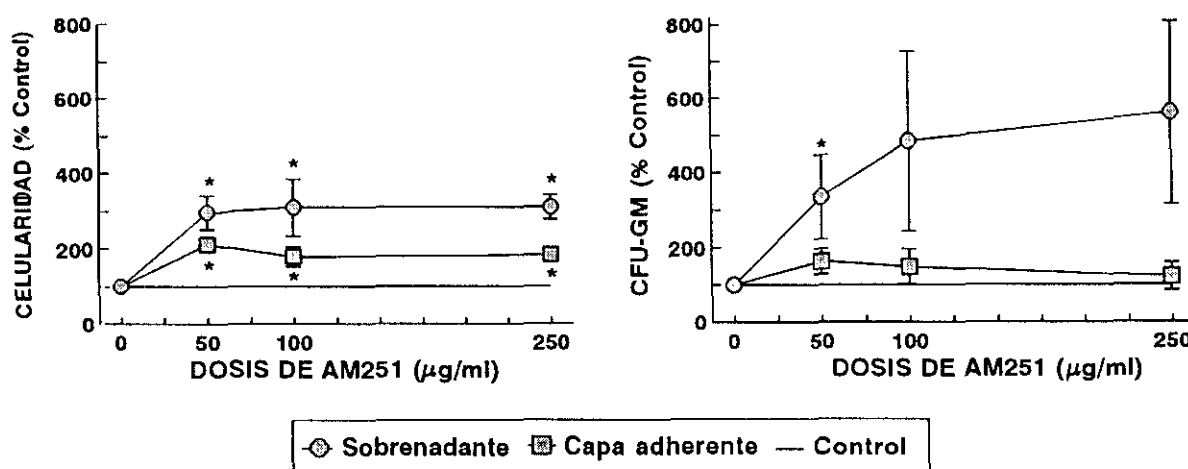
**Figura 17:** Efecto del tratamiento *in vitro* con distintas dosis del polisacárido AM218 sobre la celularidad y el contenido de precursores CFU-GM en el sobrenadante y en la capa adherente de LTBMCS. \* $p < 0,05$ . Valores control en el sobrenadante:  $8,70 \pm 0,68 \times 10^6$  células;  $20,28 \pm 4,70 \times 10^3$  CFU-GM y en la capa adherente:  $6,33 \pm 0,70 \times 10^6$  células;  $37,45 \pm 8,50 \times 10^3$  CFU-GM.

En el caso de LTBMCS tratados con AM250, se observó un incremento máximo de la celularidad del sobrenadante y capa adherente de 2,5 y 1,8 veces respectivamente (figura 18). El contenido de precursores CFU-GM en el sobrenadante de cultivos tratados fue superior al de los sobrenadantes control, con incrementos de 2,5 veces (figura 18). En la capa adherente ninguna de las dosis de AM250 ensayadas provocó variaciones significativas en los niveles de CFU-GM (figura 18).



**Figura 18:** Efecto del tratamiento *in vitro* con distintas dosis del polisacárido AM250 sobre la celularidad y el contenido de precursores CFU-GM en el sobrenadante y en la capa adherente de LTBMCS. \* $p < 0,05$ . Valores control en pie de figura 17.

Cuando los cultivos se trataron con AM251, la celularidad del sobrenadante y de la capa adherente aumentó significativamente respecto a cultivos control (3,0 y 2,0 veces respectivamente) (figura 19). El contenido de precursores CFU-GM en la capa adherente no se modificó como consecuencia del tratamiento con AM251. Respecto al sobrenadante, la dosis más baja de AM251 provocó un aumento en el contenido de CFU-GM de 3,3 veces respecto al control. Con dosis más altas de AM251, si bien se observó una tendencia hacia niveles aumentados de precursores CFU-GM en el sobrenadante, las diferencias con el control no eran estadísticamente significativas (figura 19).



**Figura 19:** Efecto del tratamiento *in vitro* con distintas dosis del polisacárido AM251 sobre la celularidad y el contenido de precursores CFU-GM en el sobrenadante y en la capa adherente de LTBMCS. \* $p < 0,05$ . Valores control en pie de figura 17.

Estos resultados ponen de manifiesto que los tres polisacáridos objeto de estudio, cuando se administran al LTBMCS poseen capacidad para estimular la hematopoyesis medular, si bien este efecto no era detectado tras el tratamiento *in vivo* con estos polisacáridos.

#### 4.1.3. Análisis de la capacidad radioprotectora de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 en animales con síndrome hematopoyético provocado por radiación

Demostrada la capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para estimular el sistema hematopoyético de ratones normales, se analizó su efecto en ratones mielosuprimidos como consecuencia de la exposición a radiaciones ionizantes. Así, en este apartado se aborda el estudio de la capacidad radioprotectora de los tres polisacáridos, en animales sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, así como la capacidad de estos polisacáridos para acelerar la recuperación hematopoyética en ratones irradiados con dosis subletales.

En los ensayos realizados con radiación hay que tener en cuenta dos nuevas variables que no aparecen en ensayos realizados en ratones normales:

- Dosis de radiación. El daño provocado por la radiación va a ser directamente proporcional a la dosis administrada. Así, en función del tipo de estudio a realizar, será necesaria la selección previa de la dosis de radiación adecuada. En este trabajo, las dosis de radiación utilizadas entran dentro del rango de dosis que provocan síndrome hematopoyético (Grande y col., 1990; Real y col., 1992; Grande y col., 1993).
- Pauta de administración. Intervalo de tiempo transcurrido entre la administración del polisacárido y la exposición a la radiación. Esta variable va a condicionar tanto el efecto radioprotector del polisacárido como sus potenciales aplicaciones en terapias de apoyo (Real, 1991).

#### **4.1.3.1. Radioprotección conferida por los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 en ratones irradiados con dosis potencialmente letales**

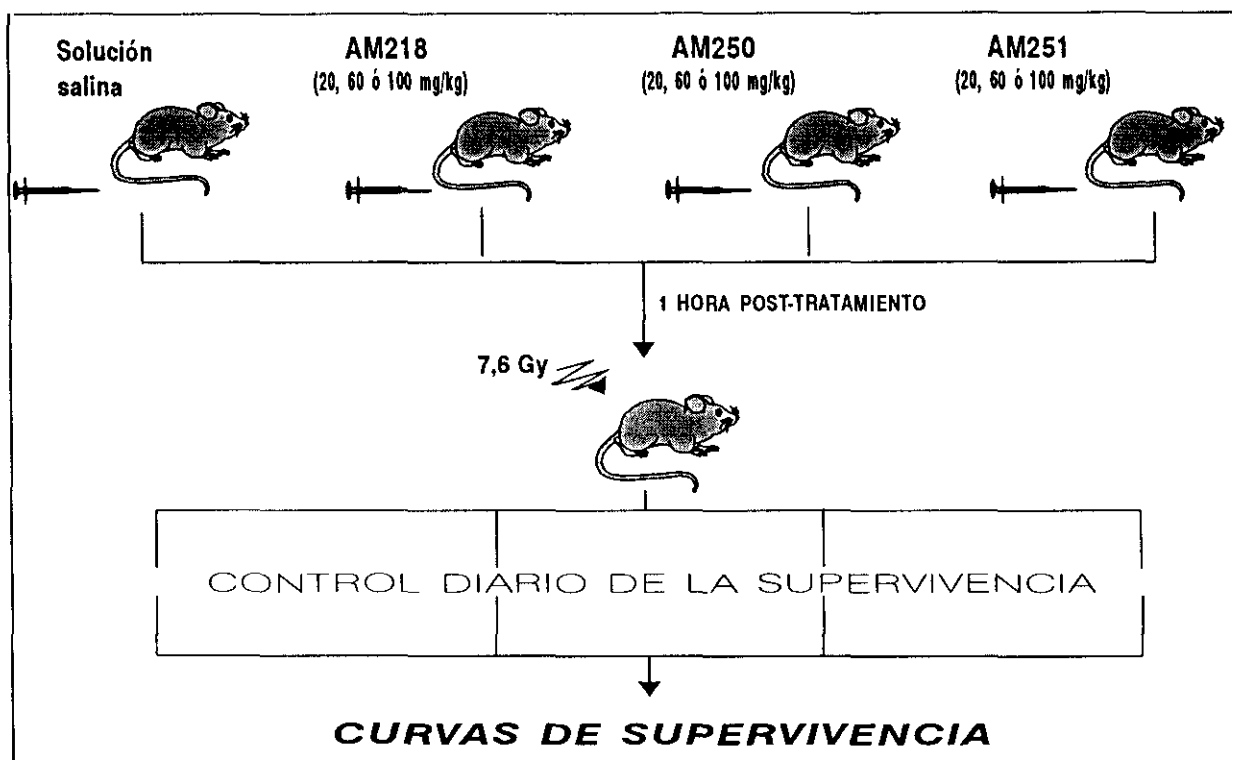
Dado que en el rango de dosis de radiación utilizado, la muerte del animal acontece como consecuencia del síndrome de la médula ósea, la supervivencia de éstos va a reflejar el efecto radioprotector de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre el sistema hematopoyético. Así, la capacidad radioprotectora de estos polisacáridos se ha determinado a través de su efecto sobre la supervivencia de ratones sometidos a dosis de radiación potencialmente letales. La dosis de radiación elegida (7,6 Gy) produce la muerte del animal por síndrome de la médula ósea a los 10-15 días de su exposición. A esta dosis, la supervivencia de ratones control a los 30 días no supera el 20% (Real y col., 1992).

##### **4.1.3.1.a. Influencia de la dosis de polisacárido administrada sobre su efecto radioprotector**

Teniendo en cuenta los estudios previos sobre ratones normales, sabemos que los polisacáridos analizados son activos tras una única dosis *i.v.* de 60-100 mg/kg, sin embargo, en ratones irradiados al estar el sistema hematopoyético fuertemente dañado, dosis menores de polisacárido pudieran ser también efectivas, por lo que se incluyó la de 20 mg/kg junto con las dosis de 60 y 100 mg/kg.

Resultados del laboratorio y de la bibliografía (Maisin y col., 1986; Real y col., 1992; Floersheim, 1993) ponen de manifiesto que generalmente la administración de un producto entre 24 y 1 hora antes de la irradiación, lleva asociada el mayor efecto radioprotector. En función de esto, la pauta de administración de los polisacáridos utilizada en los ensayos de supervivencia fue la de 1 hora antes de la irradiación.

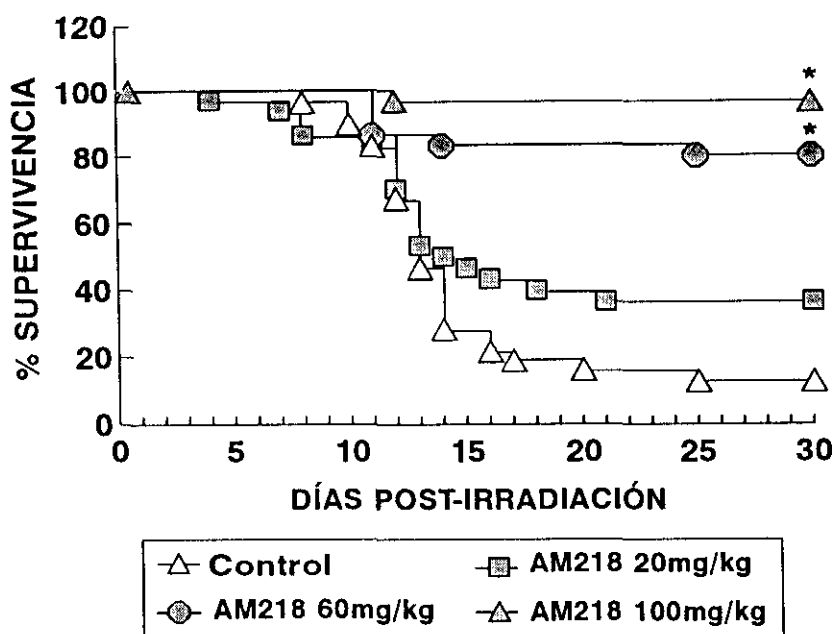
El protocolo experimental seguido se muestra en la figura 20. Los ratones fueron tratados *i. v.* con dosis únicas (20, 60 ó 100 mg/kg) de AM218, AM250 y AM251 una hora antes de someterlos a una irradiación de 7,6 Gy. Durante 30 días se registró diariamente la supervivencia de cada uno de los grupos tratados y de un lote control irradiado con la misma dosis, construyéndose una vez transcurrido ese tiempo las curvas de supervivencia correspondientes.



**Figura 20:** Esquema del protocolo utilizado para el estudio de la capacidad radioprotectora de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 en ratones sometidos a una dosis de radiación potencialmente letal.

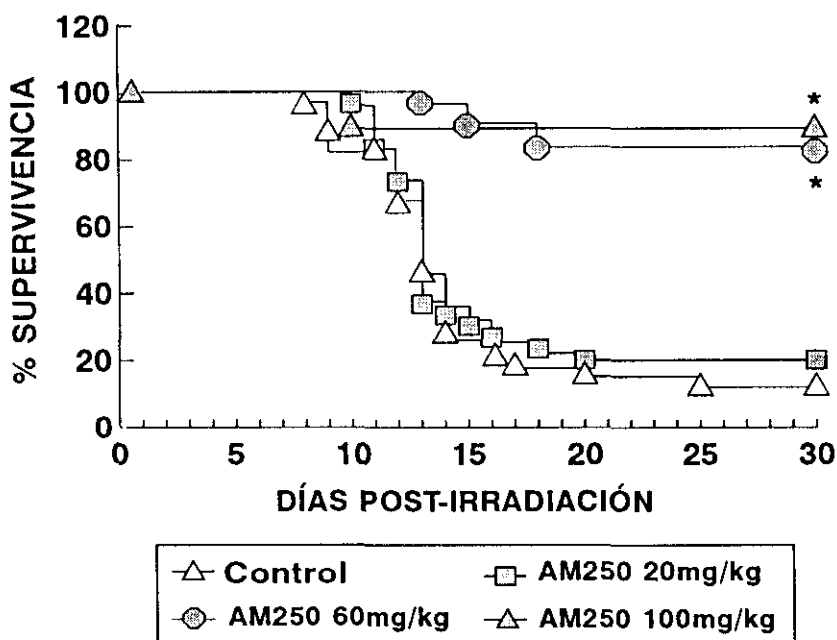
El tratamiento con las dosis de 60 y 100 mg/kg de **AM218** aumentó de manera significativa la supervivencia de los ratones sometidos a una dosis de radiación potencialmente letal, 82% y 96% de supervivencia respectivamente, frente a un 12% en el grupo control (figura 21). La administración de 20 mg/kg de AM218 produjo una supervivencia del 36% que no era significativamente superior a la supervivencia del grupo control.





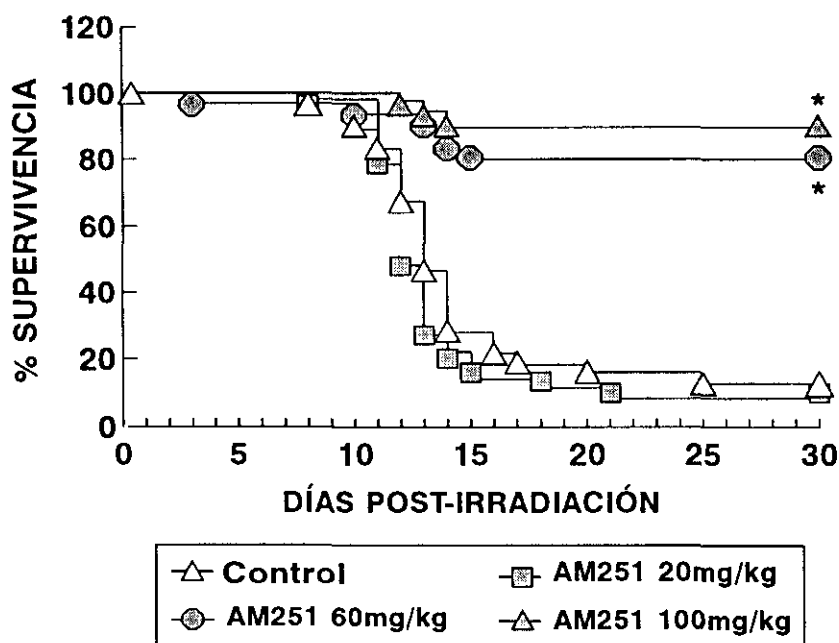
**Figura 21:** Curvas de supervivencia de ratones tratados con distintas dosis de AM218 una hora antes de una dosis de radiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

Ratones tratados con 60 y 100 mg/kg de AM250 una hora antes de la irradiación mostraban niveles de supervivencia del 90% y 96% respectivamente, los cuales eran significativamente superiores a los del grupo control (12%) (figura 22). El tratamiento con dosis inferiores de AM250 (20 mg/kg) no mejoró la supervivencia respecto a los ratones control, con valores del 20% de supervivencia.



**Figura 22:** Curvas de supervivencia de ratones tratados con distintas dosis de AM250 una hora antes de una dosis de radiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

De manera similar a los polisacáridos anteriores, el **AM251** mostró una elevada capacidad radioprotectora cuando era administrado 1 hora antes de la irradiación a dosis de 60 y 100 mg/kg (82% y 90% de supervivencia respectivamente frente a un 10% en el control) (figura 23). Dosis más bajas de AM251 (20 mg/kg) no fueron capaces de mejorar la supervivencia de ratones sometidos a dosis potencialmente letales de radiación (10% de supervivencia), como en el caso del AM218 y AM250.



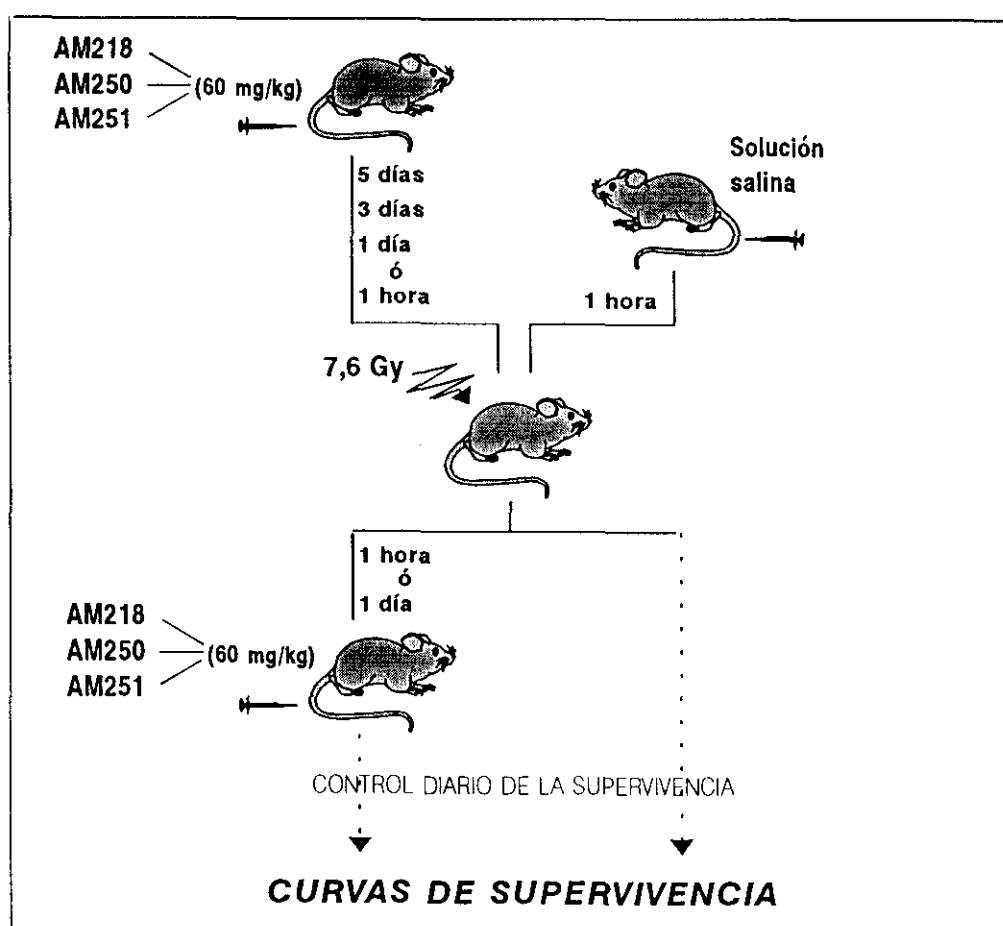
**Figura 23:** Curvas de supervivencia de ratones tratados con distintas dosis de AM251 una hora antes de una dosis de radiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

Los resultados ponen de manifiesto que los tres polisacáridos ensayados son unos potentes radioprotectores, cuando dosis de 60 ó 100 mg/kg se administran 1 hora antes de la irradiación, no encontrándose diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia obtenidos para esas dosis entre los distintos polisacáridos.

#### 4.1.3.1.b. *Influencia de la pauta de administración en la radioprotección conferida por los polisacáridos*

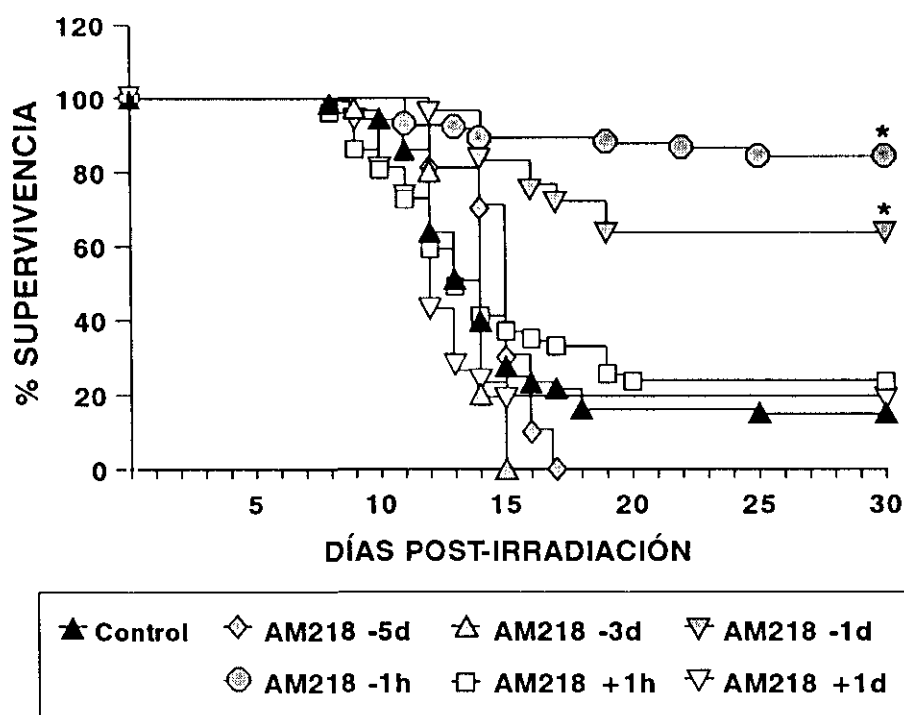
La pauta de administración del compuesto condiciona en muchos casos el efecto radioprotector inducido. Así, una vez descrita la capacidad radioprotectora de estos polisacáridos cuando son administrados 1 hora antes de la irradiación, se analizó si dicho efecto se veía modificado al variar la pauta de administración.

El protocolo utilizado se muestra en la figura 24. Al no observarse diferencias significativas en la radioprotección conferida por 60 ó 100 mg/kg de cualquiera de los polisacáridos, la dosis utilizada fue de 60 mg/kg. El tratamiento con los polisacáridos se llevó a cabo 5, 3, 1 día ó 1 hora antes de la irradiación, o bien 1 hora ó 1 día después de la irradiación. El experimento también contó con un lote control irradiado con la misma dosis (7,6 Gy) e inyectado con solución salina. Durante 30 días se registró la supervivencia de los distintos lotes, construyéndose posteriormente las curvas de supervivencia.



**Figura 24:** Esquema del protocolo utilizado para el estudio del efecto de distintas pautas de administración de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, sobre la supervivencia de ratones sometidos a una dosis de radiación potencialmente letal.

El tratamiento con **AM218** 1 día antes de la irradiación aumentó significativamente la supervivencia respecto al control (65% frente a un 15%), si bien este efecto era menor que el producido con el tratamiento 1 hora antes de la irradiación (82%). Con las otras pautas de administración ensayadas no se observaron aumentos significativos de la supervivencia (figura 25).

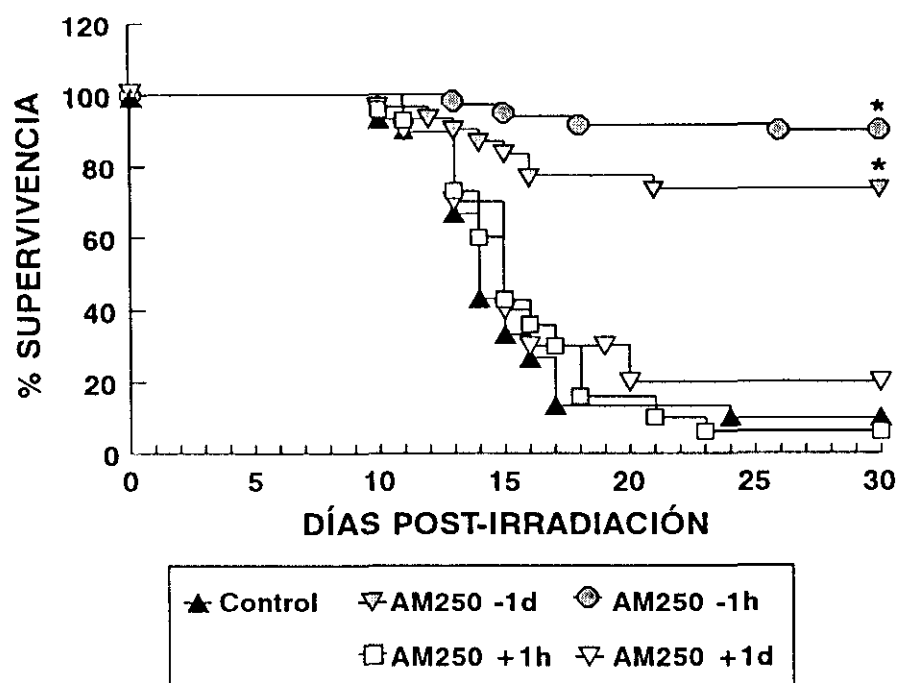


**Figura 25:** Efecto de distintas pautas de administración de **AM218** sobre la supervivencia de ratones sometidos a una dosis de radiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

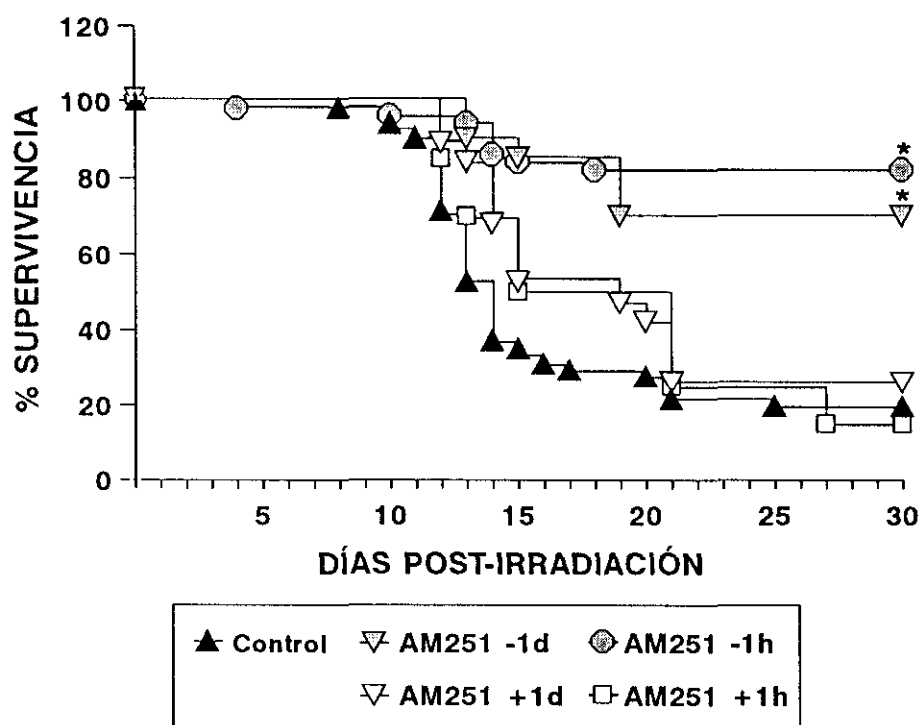
Las pautas de administración de 5 y 3 días antes de la radiación no se ensayaron con los polisacáridos **AM250** y **AM251**, ya que como se muestra en la figura 25, esas pautas con el polisacárido **AM218** no mejoraron la supervivencia respecto a los controles irradiados mostrando un 100% de mortalidad ya en los días 15-17 post-irradiación.

El tratamiento con **AM250** un día antes de la irradiación aumentó la supervivencia hasta un 80% respecto al 10% de supervivencia en los controles (figura 26). Este aumento de la supervivencia no difería significativamente respecto al 90% de supervivencia que se obtenía tras el tratamiento 1 hora antes de la irradiación. Cuando el tratamiento con **AM250** se realizaba 1 hora ó 1 día después de la irradiación no se produjo aumento de la supervivencia respecto al control irradiado, obteniéndose valores de supervivencia de 6 y 20% respectivamente.

Con el polisacárido **AM251** se utilizaron las mismas pautas de administración que con el **AM250**. El tratamiento 1 día antes de la irradiación produjo un aumento de la supervivencia del 70% frente a un 16% en el lote control. Al igual que con el **AM250**, no existían diferencias significativas entre los valores de supervivencia obtenidos al administrar el **AM251** un día ó 1 hora antes de la irradiación (70% frente a un 82%). Los tratamientos de 1 hora ó 1 día después de la irradiación no produjeron un aumento significativo de la supervivencia (15 y 26% respectivamente) (figura 27).



**Figura 26:** Efecto de distintas pautas de administración de AM250 sobre la supervivencia de ratones sometidos a una dosis de radiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

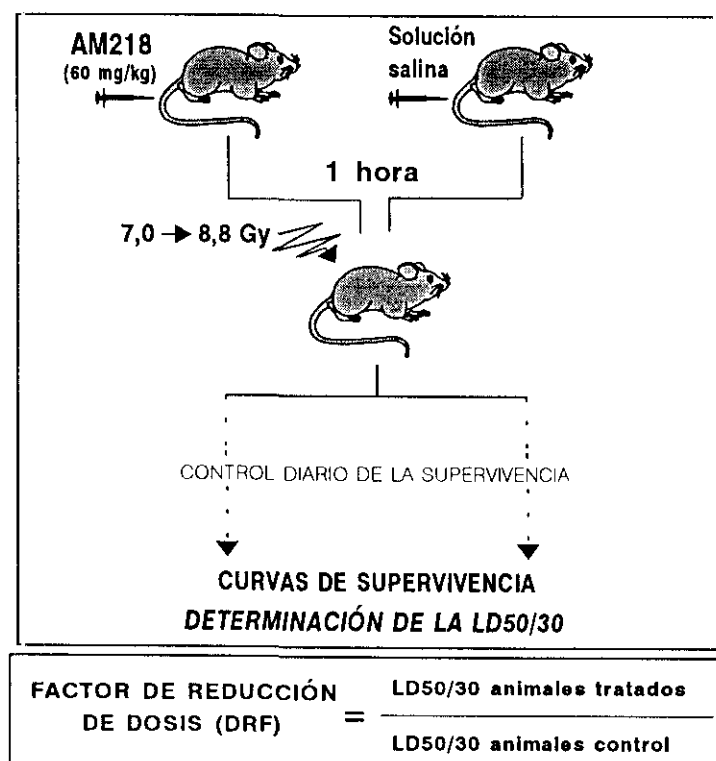


**Figura 27:** Efecto de distintas pautas de administración de AM251 sobre la supervivencia de ratones sometidos a una dosis de radiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

Estos resultados ponen de manifiesto que los tres polisacáridos son unos potentes radioprotectores cuando se administran 1 día ó 1 hora antes de una irradiación potencialmente letal, mientras que los tratamientos después de la irradiación no mostraban efecto sobre la supervivencia.

#### 4.1.3.1.c. Determinación del factor de reducción de dosis (DRF)

En los experimentos anteriores, la magnitud de la radioprotección conferida por estos polisacáridos se ha ensayado comparando porcentajes de supervivencia entre grupos control y tratado a una determinada dosis de radiación. Una forma más precisa de definir la capacidad radioprotectora de un compuesto es calcular su factor de reducción de dosis (DRF), valor que nos indica cuánto podemos aumentar la dosis de radiación en el grupo tratado para conseguir la misma supervivencia que en el grupo control. Este valor, al ser un cociente, es independiente del rango de dosis de radiación utilizado, frente a los experimentos de supervivencia en los que es determinante.



**Figura 28:** Protocolo utilizado en el cálculo del DRF del polisacárido AM218.

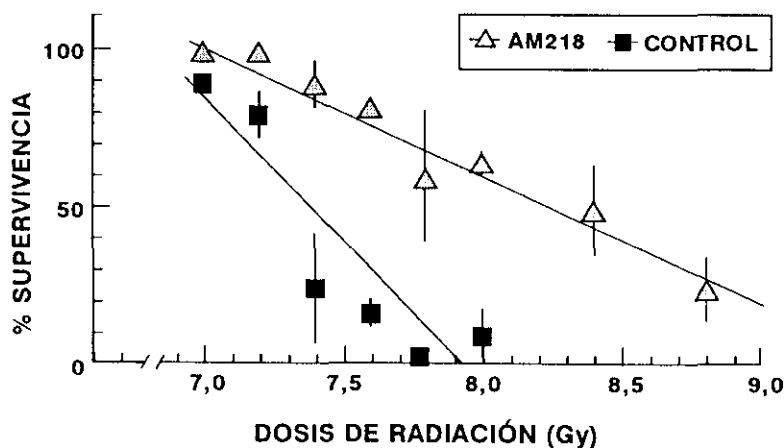
Para estos ensayos se seleccionó el polisacárido AM218 dado que, como se ha visto anteriormente, no existían diferencias significativas entre las supervivencias de ratones tratados con cualquiera de los tres polisacáridos (82%, 90% y 82% para el AM218, AM250

y AM251 respectivamente). El protocolo utilizado en el cálculo del DRF se muestra en la figura 28. Los ratones fueron tratados por vía *i.v.* con 60 mg/kg de AM218 o solución salina 1 hora antes de ser sometidos a distintas dosis de radiación. El rango de dosis de radiación utilizado fue de 7,0 a 8,8 Gy. Para cada una de las 8 dosis de radiación utilizadas se contó con un lote control y otro tratado con AM218, con un mínimo de 10 ratones por lote. Durante 30 días se controló la supervivencia, determinándose la LD50/30 (dosis letal para el 50% de los animales a 30 días) para el grupo tratado con AM218 ( $D_1$ ) y el grupo control ( $D_2$ ). El cociente entre ambas LD50/30 ( $D_1/D_2$ ), nos proporciona el valor del DRF (figura 28).

	7,0 Gy	7,2 Gy	7,4 Gy	7,6 Gy	7,8 Gy	8,0 Gy	8,4 Gy	8,8 Gy
Control	90±0	80±7	25±17	17±4	0	10±7	0	0
AM218 (-1h)	100±0	100±0	90±7	82±0	60±21	65±3	50±14	25±10

**Tabla V:** Porcentajes de supervivencia de ratones control y tratados con AM218 una hora antes de ser sometidos a distintas dosis de radiación.

En la tabla V se muestran las supervivencias del grupo control y tratado con AM218 30 días después de ser sometidos a distintas dosis de radiación. Para calcular las LD50/30 de ambos grupos, los porcentajes de supervivencia se representaron frente a las distintas dosis de radiación según el ajuste de mínimos cuadrados (figura 29). De la ecuación de la recta se obtuvo una LD50/30 de 8,3 Gy para los ratones tratados con AM218 y de 7,4 Gy para el grupo control, siendo el DRF de 1,12. Este valor del DRF nos indica un alto nivel de radioprotección conferido por el AM218.

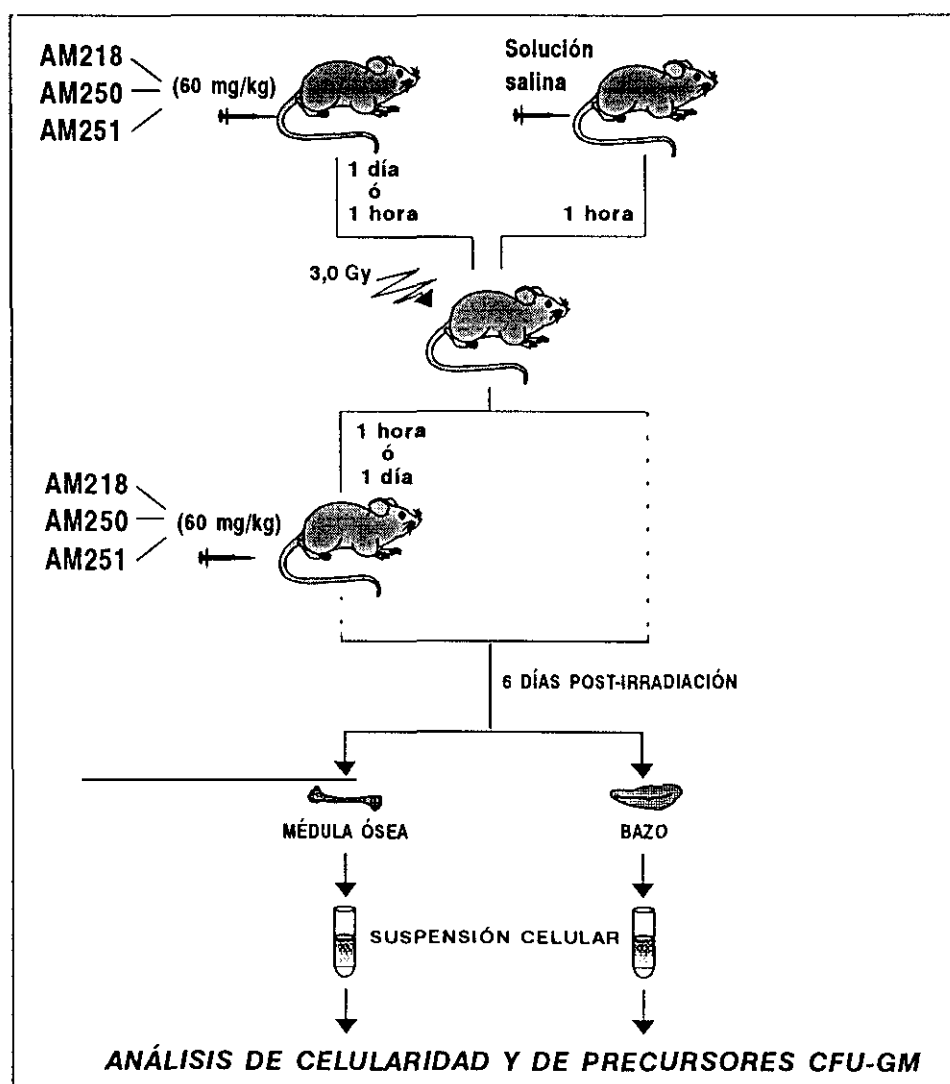


**Figura 29:** Representación según el ajuste de mínimos cuadrados para el cálculo del DRF del AM218 (60 mg/kg *i.v.*) administrado 1 hora antes de la irradiación.

#### 4.1.3.2. Efecto de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre la hematopoyesis de ratones irradiados con una dosis subletal

Una vez demostrado el efecto radioprotector de dichos polisacáridos en animales sometidos a irradiación potencialmente letal, se estudió su capacidad para favorecer la recuperación hematopoyética en ratones sometidos a dosis subletales de radiación.

Se utilizó la dosis de 3,0 Gy como dosis subletal, ya que es una dosis lo suficientemente alta para aplasiar el sistema hematopoyético, pero no en un grado tal que impida realizar análisis cuantitativos de precursores. El análisis de precursores se realizó 6 días después de la irradiación, puesto que en ese día se puede cuantificar experimentalmente el contenido de precursores CFU-GM en médula ósea y bazo, y los valores de esos precursores están aún muy por debajo de los niveles control (Real, 1991).



**Figura 30:** Esquema del protocolo utilizado para estudiar la capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para favorecer la recuperación hematopoyética tras una irradiación subletal.



En estos estudios se utilizaron distintas pautas de administración de los tres polisacáridos que coincidían con las utilizadas en los ensayos de supervivencia. El protocolo experimental utilizado en estos ensayos se muestra en la figura 30. A los ratones se les administró por vía *i.v.* 60 mg/kg de polisacárido 1 día ó 1 hora antes de la irradiación, y a otros 2 grupos se les trató 1 hora ó 1 día después de la irradiación (3,0 Gy). El experimento contó con un lote control irradiado con la misma dosis e inyectado con solución salina. A los 6 días después de la irradiación, se determinó la celularidad y contenido de CFU-GM tanto en médula ósea como en bazo de los diferentes lotes (figura 30).

Los resultados obtenidos con el polisacárido **AM218** se presentan en la tabla VI. En comparación con animales irradiados no tratados, en la médula ósea se observó estimulación en los niveles de precursores CFU-GM cuando el AM218 fue administrado 1 día después de la irradiación. La celularidad, tanto en la médula ósea como en el bazo, aumentó significativamente con el tratamiento de 1 día antes de la irradiación. Los niveles de precursores CFU-GM en bazo aumentaron significativamente con el tratamiento de AM218 un día ó 1 hora antes de la irradiación, así como con el tratamiento 1 día después de la irradiación.

	CÉLULAS/ FÉMUR (%)	CFU-GM/ FÉMUR (%)	CÉLULAS/ BAZO (%)	CFU-GM/ BAZO (%)
AM218 (-1d)	149 ± 16*	142 ± 34	191 ± 20*	1.277 ± 434*
AM218 (-1h)	110 ± 14	129 ± 23	149 ± 37	1.132 ± 325*
AM218 (+1h)	140 ± 27	137 ± 24	149 ± 37	1.541 ± 723
AM218 (+1d)	111 ± 19	158 ± 20*	110 ± 12	2.062 ± 900*

**Tabla VI:** Efecto de distintas pautas de administración de **AM218** (60 mg/kg *i.v.*) sobre el contenido de precursores CFU-GM de fémur y bazo 6 días después de una irradiación subletal (3,0 Gy). Los valores son porcentajes  $\pm$  error estándar, respecto a ratones control irradiados. \* $p < 0,05$ . Valores control en fémur de ratones irradiados:  $14,2 \pm 0,6 \times 10^6$  células;  $2,4 \pm 0,3 \times 10^3$  CFU-GM y en bazo:  $52,8 \pm 5,2 \times 10^6$  células;  $72,0 \pm 20,0$  CFU-GM.

Los resultados obtenidos con el polisacárido **AM250** se muestran en la tabla VII. En médula ósea se observó un aumento significativo de la celularidad con el tratamiento 1 hora antes de la irradiación, mientras que el contenido de precursores CFU-GM en médula ósea no se estimulaba con ninguno de los tratamientos. En el bazo se observó un fuerte aumento en el número de precursores CFU-GM cuando el AM250 se administraba 1 día, 1 hora antes ó 1 día después de la irradiación (tabla VII).

	CÉLULAS/ FÉMUR (%)	CFU-GM/ FÉMUR (%)	CÉLULAS/ BAZO (%)	CFU-GM/ BAZO (%)
AM250 (-1d)	99 ± 15	122 ± 30	158 ± 33	446 ± 130*
AM250 (-1h)	150 ± 20*	150 ± 27	149 ± 48	1.686 ± 579*
AM250 (+1h)	131 ± 8	144 ± 31	134 ± 30	990 ± 408*
AM250 (+1d)	101 ± 26	108 ± 19	69 ± 14	404 ± 127

**Tabla VII:** Efecto de distintas pautas de administración de AM250 (60 mg/kg *i.v.*) sobre el contenido de precursores CFU-GM de fémur y bazo, 6 días después de una irradiación subletal (3,0 Gy). Los valores son porcentajes ± error estándar, respecto a ratones control irradiados. \* $p < 0,05$ .

Valores control en fémur de ratones irradiados:  $10,3 \pm 1,2 \times 10^6$  células;  $3,6 \pm 0,6 \times 10^3$  CFU-GM y en bazo:  $37,1 \pm 7,7 \times 10^6$  células;  $52,0 \pm 7,0$  CFU-GM.

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos en ratones subletalmente irradiados tratados con AM251. En médula ósea no se observó estimulación de la celularidad, ni de precursores CFU-GM con ninguna de las pautas de administración utilizadas. La celularidad del bazo tampoco se vió estimulada, mientras que los niveles de precursores CFU-GM se vieron fuertemente aumentados cuando los ratones se trataron, bien 1 hora antes ó 1 hora ó 1 día después de la irradiación. La máxima estimulación se produjo cuando los ratones se trataron con AM251 una hora antes de la irradiación.

	CÉLULAS/ FÉMUR (%)	CFU-GM/ FÉMUR (%)	CÉLULAS/ BAZO (%)	CFU-GM/ BAZO (%)
AM251 (-1d)	105 ± 25	102 ± 12	102 ± 18	457 ± 215
AM251 (-1h)	118 ± 12	112 ± 7	106 ± 16	1.586 ± 455*
AM251 (+1h)	114 ± 11	104 ± 7	106 ± 16	814 ± 316*
AM251 (+1d)	92 ± 9	90 ± 12	104 ± 17	857 ± 355*

**Tabla VIII:** Efecto de distintas pautas de administración de AM251 (60 mg/kg *i.v.*) sobre el contenido de precursores CFU-GM de fémur y bazo, 6 días después de una irradiación subletal (3,0 Gy). Los valores son porcentajes ± error estándar, respecto a ratones control irradiados. \* $p < 0,05$ .

Valores control en fémur de ratones irradiados:  $15,8 \pm 1,0 \times 10^6$  células;  $4,9 \pm 0,3 \times 10^3$  CFU-GM;  $63,4 \pm 8,3 \times 10^6$  células;  $70,0 \pm 20,0$  CFU-GM.

Los resultados obtenidos muestran la capacidad de los tres polisacáridos ensayados para aumentar el contenido de precursores CFU-GM en el bazo de los ratones irradiados con dosis

subletales. Hay que destacar que el tratamiento post-irradiación con los tres polisacáridos aumentó el contenido de precursores hematopoyéticos esplénicos, aunque estos mismos tratamientos no eran efectivos, como hemos visto, en los ensayos de supervivencia a dosis potencialmente letales.

## **4.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251 SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE RATÓN**

Una vez demostrada la capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para estimular la hematopoyesis de ratones normales y para proteger y/o facilitar la recuperación hematopoyética en ratones que han sido expuestos a la radiación, nos planteamos el estudio de algunos de los posibles mecanismos a través de los cuales los polisacáridos analizados ejercerían dichos efectos.

### **4.2.1. Mecanismos implicados en la radioprotección conferida por los polisacáridos AM218, AM250 y AM251**

Puesto que con la dosis de radiación empleada en los estudios de supervivencia, la causa principal de muerte del animal es el síndrome de la médula ósea, cabía pensar que el aumento observado en la supervivencia de ratones irradiados fuera consecuencia de una mejor recuperación del sistema hematopoyético tras el tratamiento con dichos polisacáridos.

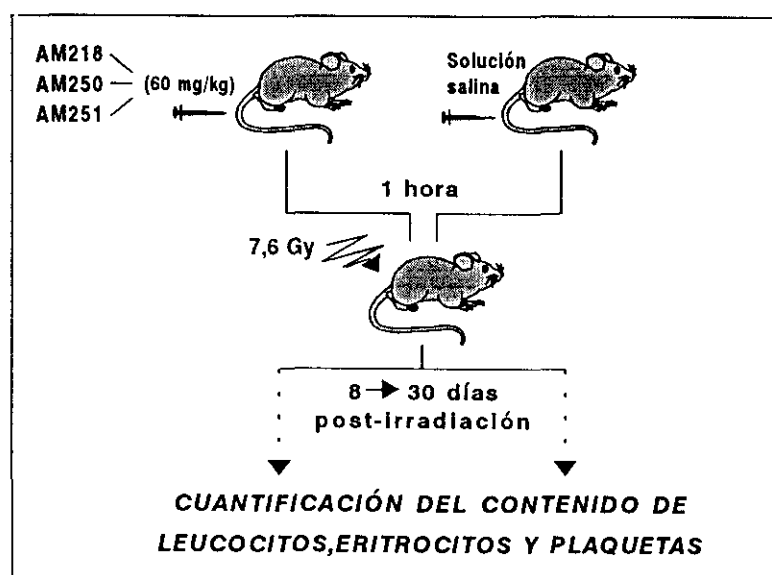
Dado que descensos en los valores de células maduras en sangre periférica conllevan la aparición de estados patológicos post-irradiación (infecciones, hemorragias, anemias, etc) que en último término provocan la muerte del individuo, en una primera aproximación se estudió la cinética de recuperación de células maduras circulantes en ratones control o tratados con los distintos polisacáridos sometidos a dosis potencialmente letales de radiación.

Por otro lado, el número de precursores hematopoyéticos supervivientes a la radiación va a condicionar la recuperación hematopoyética posterior, por lo que se analizó la capacidad del polisacárido AM218 para modificar la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos.

#### **4.2.1.1. Capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para favorecer la recuperación hematopoyética en ratones irradiados con dosis potencialmente letales**

Para confirmar la implicación hematológica en el efecto radioprotector de los polisacáridos objeto de estudio, se analizó si éstos actúan a través de la recuperación de células maduras

circulantes. Para ello, los ratones fueron tratados vía *i.v.* con 60 mg/kg de AM218, AM250 ó AM251, una hora antes de ser irradiados con una dosis potencialmente letal de rayos X (7,6 Gy), pauta de administración con efecto radioprotector en ensayos de supervivencia. A distintos días después de la irradiación (del 8 al 30) se extrajo sangre periférica tanto a los grupos tratados con los polisacáridos, como a un lote control irradiado con la misma dosis e inyectado con solución salina. En los distintos grupos se cuantificó de manera individualizada el contenido de leucocitos, eritrocitos y plaquetas en sangre periférica (figura 31). El método utilizado para la extracción de sangre, que no exige el sacrificio del animal, permitía el seguimiento de los parámetros hematológicos de los ratones a lo largo del tiempo.



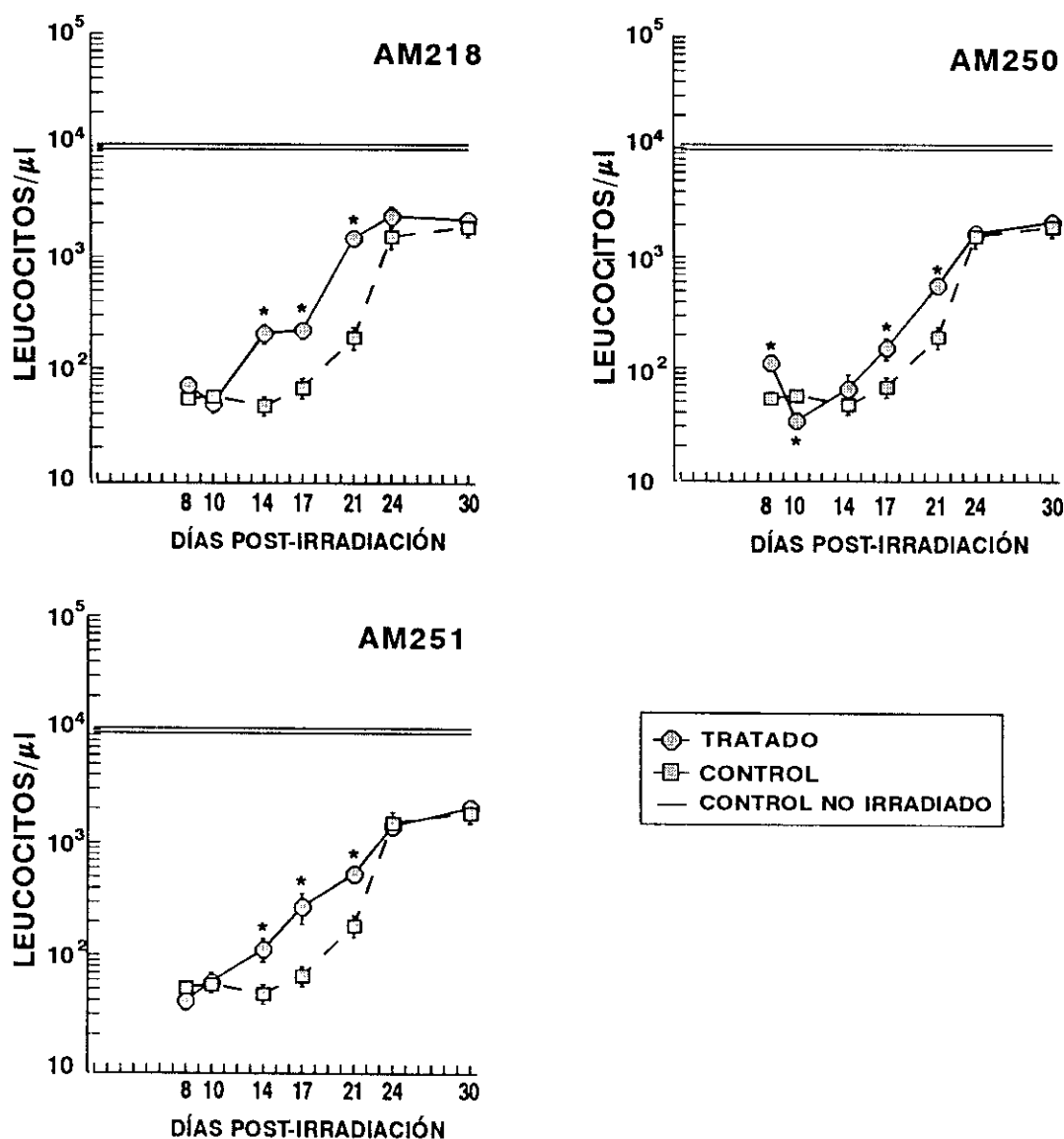
**Figura 31:** Esquema del protocolo utilizado para estudiar la capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para acelerar la recuperación de células maduras en sangre periférica de ratones sometidos a dosis de radiación potencialmente letales (7,6 Gy).

Debido a la dosis de radiación utilizada, se produce una elevada mortalidad en los ratones control entre los días 10-15 post-irradiación, por lo que los valores control de células en sangre a partir de esos días corresponden a los de aquellos ratones que sobrevivieron, lo que implicaría que las diferencias entre ratones tratados y control podrían estar subestimadas.

Como era previsible, el contenido de leucocitos en la sangre de ratones irradiados decayó drásticamente como consecuencia de la irradiación, alcanzándose valores mínimos entre los días 8 y 14 (inferiores al 1% el valor del control no irradiado) (figura 32).

En ratones irradiados y tratados con los polisacáridos se observó, como en el caso de los controles irradiados, una brusca caída inicial en el contenido de leucocitos, alcanzándose un mínimo en el día 10 post-irradiación (valores del 1% el valor control) (figura 32). Sin

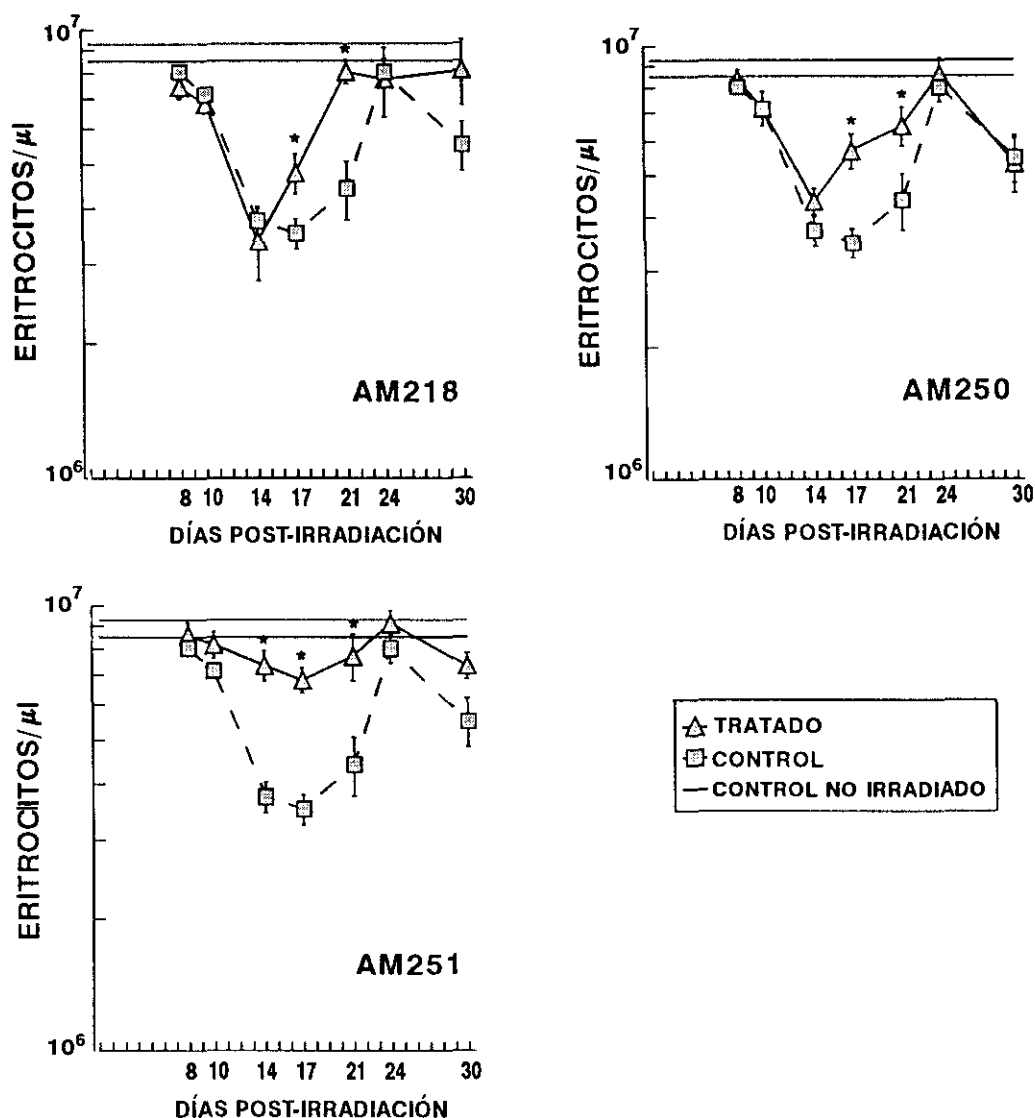
embargo, a diferencia de lo observado en los controles irradiados, los animales tratados con AM218 y AM251 comenzaban a recuperar los niveles de leucocitos ya a partir de los 10 días después de la irradiación. Los ratones tratados con AM250 mostraron niveles de leucocitos significativamente superiores al control en los días 17 y 21 post-irradiación. A partir del día 24 no se observaron diferencias significativas en los valores de leucocitos entre ratones irradiados control y tratados (figura 32).



**Figura 32:** Efecto del tratamiento con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 (60 mg/kg *i.v.*, 1 hora antes de la irradiación) sobre la recuperación de leucocitos en sangre periférica de ratones sometidos a una irradiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

El análisis del contenido de eritrocitos en sangre periférica mostró que la irradiación provocaba un descenso de éstos, alcanzándose en los días 14-17 post-irradiación el valor

mínimo que correspondía a un 40% el contenido de eritrocitos en ratones control sin irradiar (figura 33). A partir de este día comenzaba su recuperación hasta alcanzar los niveles control en el día 24 después de la irradiación, si bien en el día 30 se observaba un descenso significativo de los valores de eritrocitos (62% el valor control no irradiado).

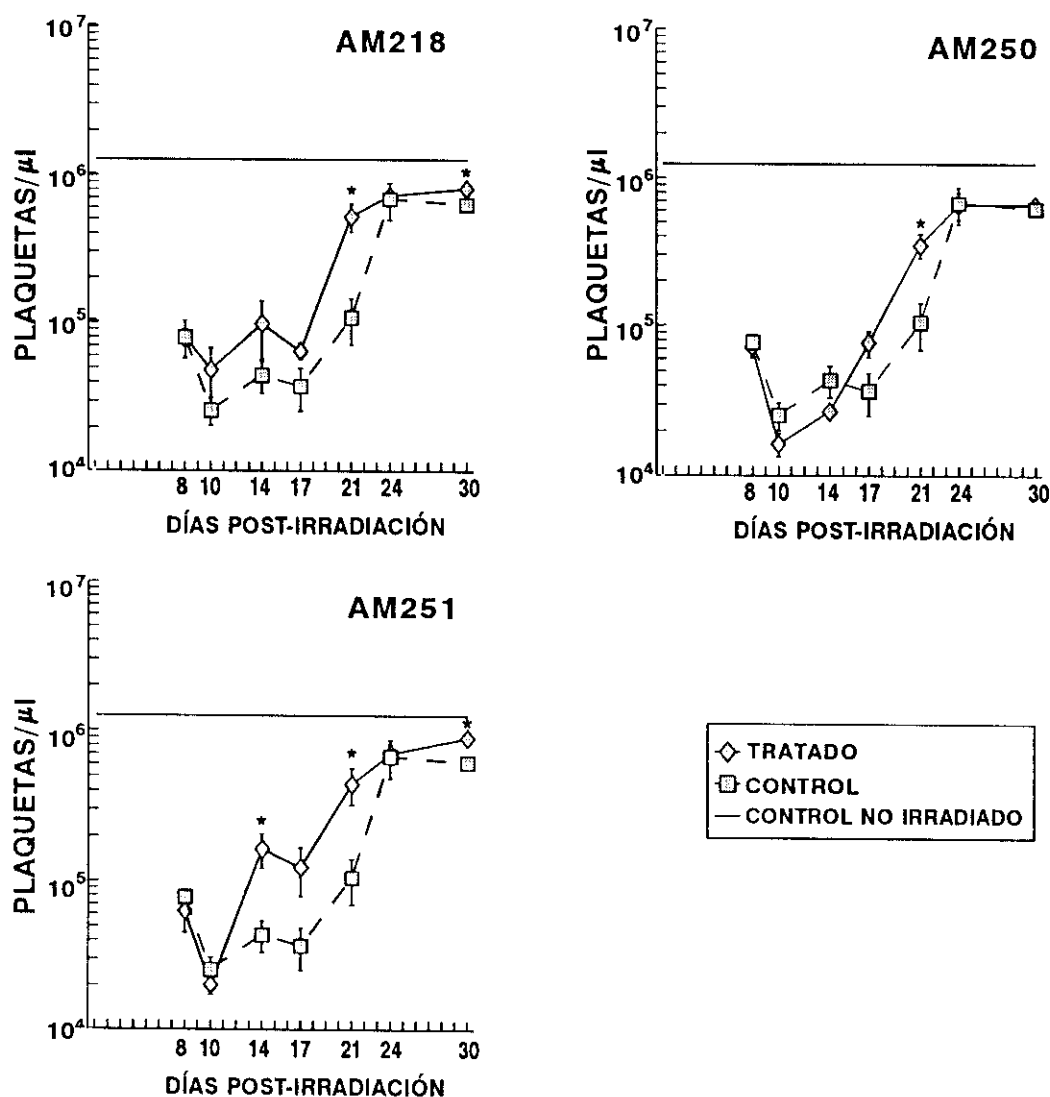


**Figura 33:** Efecto del tratamiento con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 (60 mg/kg *i.v.*, 1 hora antes de la irradiación) sobre la recuperación de eritrocitos en sangre periférica de ratones sometidos a una irradiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

En los ratones irradiados tratados con los polisacáridos, se observó distinta cinética de recuperación de eritrocitos cuando los ratones se trataron con AM251 en comparación con los grupos que habían recibido AM218 ó AM250. En estos últimos, si bien el tratamiento con el polisacárido no evitaba que tuviera lugar una fuerte caída inicial hasta el día 14, sí se observó una recuperación más rápida a partir de este día, con valores de eritrocitos

significativamente superiores al control irradiado entre los días 17-21 post-irradiación (figura 33). Por el contrario, el tratamiento con AM251 evitaba que tuviera lugar el brusco descenso de los niveles de eritrocitos en los primeros días de análisis post-irradiación. Así, ya desde el día 14 los valores de eritrocitos en estos ratones eran significativamente superiores a los del control irradiado, manteniéndose estas diferencias significativas hasta el día 24 post-irradiación.

El contenido de **plaquetas** en sangre periférica también descendió drásticamente como consecuencia de la irradiación. Así, los números de plaquetas descendieron a valores próximos al 2% del valor normal entre los días 10-17 post-irradiación, recuperándose posteriormente hasta alcanzar valores del 50% respecto del control no irradiado (figura 34).



**Figura 34:** Efecto del tratamiento con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 (60 mg/kg *i.v.*, 1 hora antes de la irradiación) sobre la recuperación de **plaquetas** en sangre periférica de ratones sometidos a una irradiación potencialmente letal (7,6 Gy). \* $p < 0,05$ .

Mientras que los ratones control irradiados necesitaban 24 días para alcanzar valores en plaquetas del 50% respecto a los controles no irradiados, los ratones tratados con los polisacáridos AM218 ó AM250 alcanzaron estos mismos valores en 21 días (figura 34). Por otro lado, la administración del polisacárido AM251 estimuló la recuperación de plaquetas a partir del día 10 post-irradiación, con diferencias significativas entre los días 14 y 21. Además, en el día 30 post-irradiación, los ratones tratados con AM218 ó AM251 mostraban una mayor recuperación en el número de plaquetas con porcentajes de 64 y 70% respectivamente frente el 50% en los controles no irradiados.

Estos resultados ponían de manifiesto que los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 son capaces de estimular la recuperación de células maduras en sangre periférica de ratones irradiados con dosis potencialmente letales, mecanismo a través del cual estos polisacáridos ejercerían su efecto radioprotector.

#### **4.2.1.2. Influencia del tratamiento con el polisacárido AM218 sobre la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos**

El hecho de que en ensayos de supervivencia se observaran los máximos efectos cuando los polisacáridos eran administrados antes de la irradiación, inducía a pensar en la posibilidad de que los polisacáridos analizados fueran capaces de alguna manera de proteger las células hematopoyéticas de la radiación, lo que implicaría un menor daño inicial y por tanto un síndrome de la médula ósea más leve tras la irradiación.

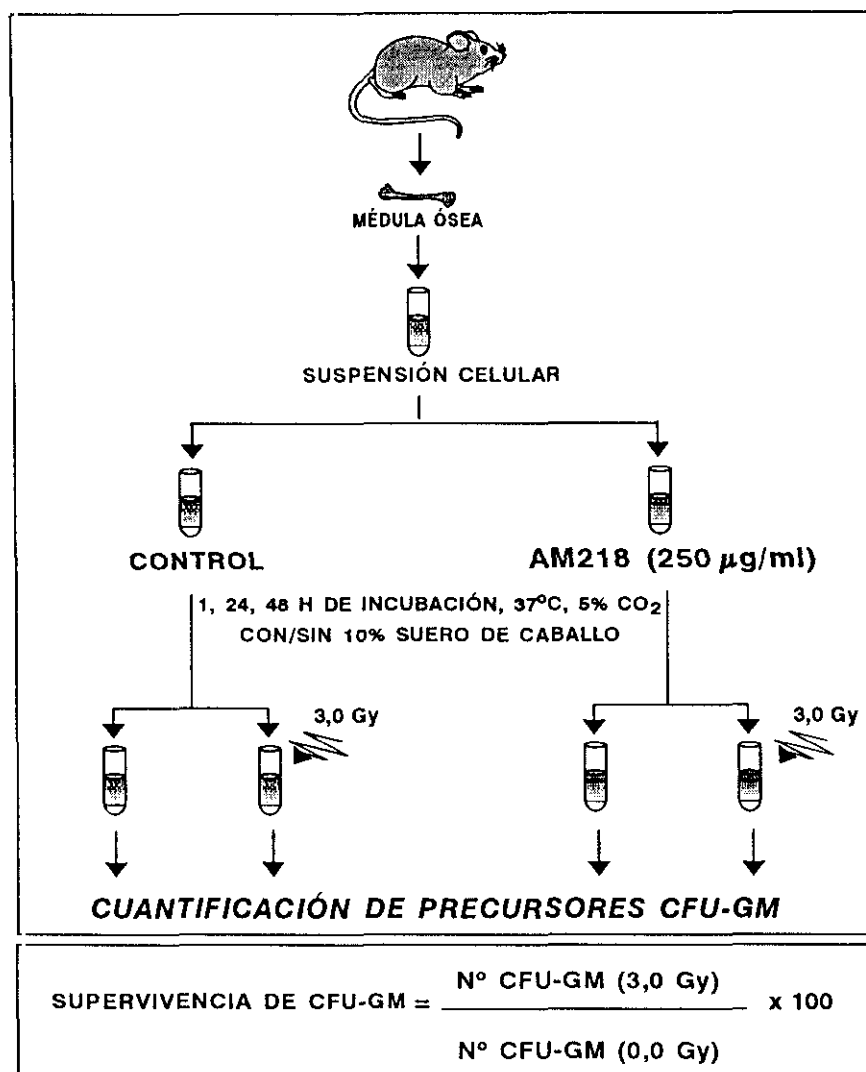
Para resolver este interrogante, se analizó la capacidad del polisacárido AM218 para modificar la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos. Se seleccionó un sólo polisacárido como representativo de la serie, ya que en estudios anteriores no se observaron diferencias importantes entre la capacidad radioprotectora mostrada por estos polisacáridos.

La primera aproximación se llevó a cabo tratando *in vitro* células de médula ósea con el polisacárido AM218, determinándose tras distintos tiempos de incubación la supervivencia de precursores CFU-GM tras una irradiación subletal, según se indica en el protocolo de la figura 35.

Una suspensión de médula ósea procedente de ratones no tratados se incubó en baño con agitación a 37°C durante 1, 24 ó 48 horas con 250 µg/ml de AM218, dosis óptima empleada en el tratamiento *in vitro* de LTBMCS (apartado 4.1.2). La incubación se detuvo introduciendo los tubos en un baño de hielo. En paralelo una alícuota de la misma suspensión de médula ósea se incubó durante los mismos períodos de tiempo pero sin AM218, alícuota que serviría de control. Transcurrido el tiempo de incubación, las suspensiones celulares fueron



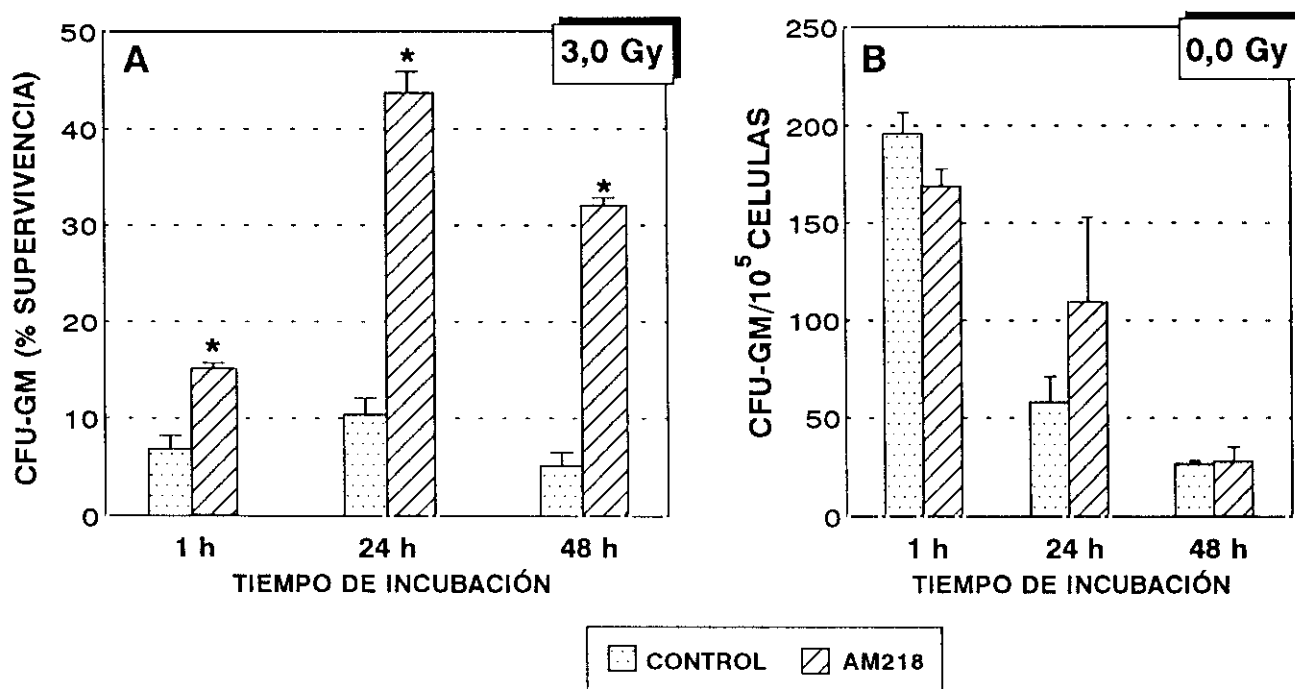
irradiadas, determinándose posteriormente el número de precursores granulo-macrofágicos (CFU-GM) (figura 35). En cada uno de los puntos, se trabajó de forma simultánea con una suspensión sin irradiar, tratada o no con AM218, que permitiría determinar el porcentaje de CFU-GM que sobreviven a la irradiación. La dosis de radiación utilizada en estos estudios fue de 3,0 Gy, dosis subletal previamente utilizada en ensayos *in vivo* (apartado 4.1.3.2)



**Figura 35:** Esquema del protocolo utilizado para estudiar la capacidad del tratamiento *in vitro* con AM218 para proteger precursores CFU-GM de las radiaciones ionizantes.

La incubación de la suspensión de médula ósea con AM218 durante 1 hora antes de la irradiación en ausencia de suero hace que la supervivencia de las CFU-GM aumente significativamente respecto a la suspensión sin tratar (15% y 7% respectivamente) (figura 36A). Si se prolongaba el período de incubación con AM218 a 24 horas, la radioprotección aumentaba considerablemente con un porcentaje de supervivencia de CFU-GM del 44% frente

a un 10% en la suspensión sin tratar. Períodos de incubación más prolongados (48 horas) rendían tras la irradiación una supervivencia de CFU-GM en la suspensión control del 5%, si bien hay que tener en cuenta que los precursores hematopoyéticos no pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en ausencia de suero (figura 36B). El tratamiento con AM218 durante 48 horas permitía que un número mayor de precursores CFU-GM sobreviviera a la radiación (32%) (figuras 36A). Como la presencia de AM218 no afectaba a la concentración de precursores CFU-GM en ninguno de los tiempos de incubación (figura 36B), el aumento observado en la supervivencia tras la irradiación no se debía a que el número de precursores CFU-GM en la suspensión tratada fuera mayor que en la control, en el momento de la irradiación.

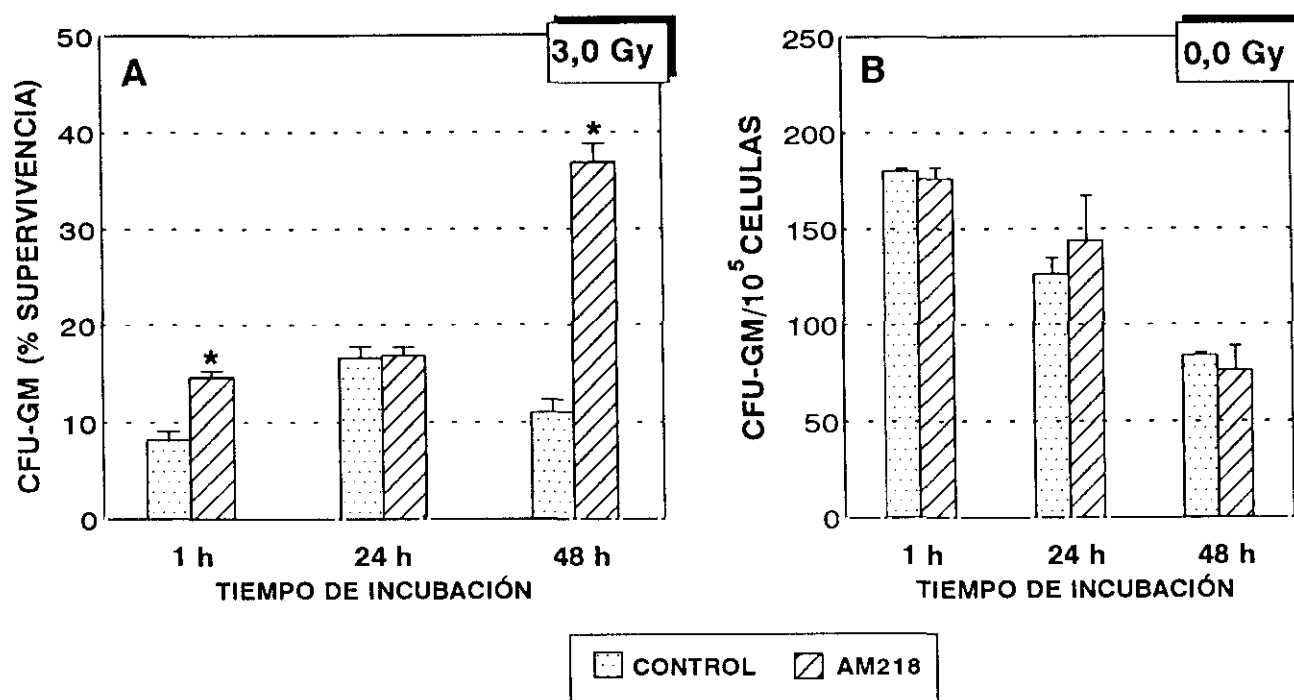


**Figura 36:** Efecto del tratamiento *in vitro* con 250  $\mu$ g/ml de AM218 en ausencia de suero, (A) sobre la supervivencia de precursores hematopoyéticos CFU-GM tras una irradiación subletal (3,0 Gy) y (B) sobre el número de precursores CFU-GM a distintos tiempos de incubación. \*p < 0,05.

Debido al descenso en el número de precursores hematopoyéticos que tiene lugar a tiempos de incubación prolongados en ausencia de suero (figura 36B), se llevó a cabo un estudio igual al descrito en la figura 35 pero añadiendo un 10% (v/v) de suero de caballo a las distintas suspensiones.

En este caso, la incubación durante 1 ó 48 horas con AM218 provocaba un aumento significativo en la supervivencia de CFU-GM (15% y 37% respectivamente) respecto a la suspensión no tratada incubada también en presencia de suero (8% y 11% respectivamente)

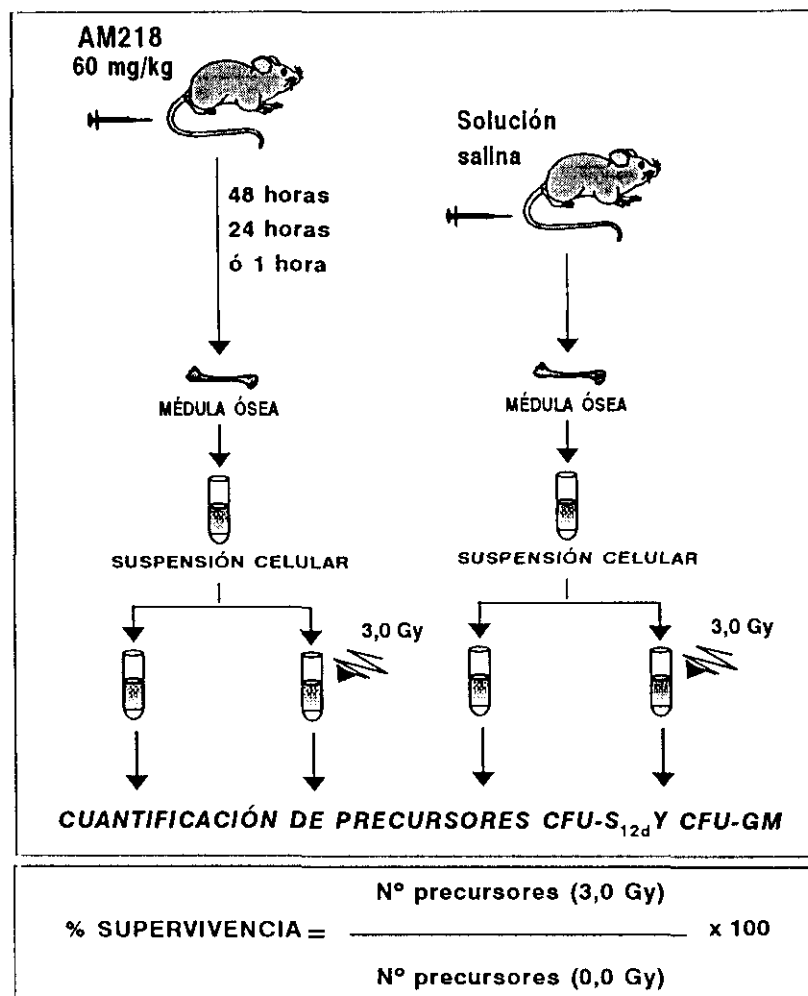
(figura 37). La incubación con AM218 durante 24 horas no aumentó la supervivencia de CFU-GM respecto a la observada en la suspensión control (16% en ambos casos). Al igual que en ausencia de suero, estos aumentos de la supervivencia no se deben a que la presencia de AM218 durante la incubación aumente la concentración de precursores CFU-GM, ya que ésta no varía a ninguno de los tiempos de incubación (figura 37B).



**Figura 37:** Efecto del tratamiento *in vitro* con 250  $\mu\text{g/ml}$  de AM218 en presencia de suero, (A) sobre la supervivencia de precursores hematopoyéticos CFU-GM tras una irradiación subletal (3,0 Gy) y (B) sobre el número de precursores hematopoyéticos CFU-GM a distintos tiempos de incubación. \*p < 0,05.

Una vez descrito que el tratamiento *in vitro* con AM218 es capaz de disminuir la radiosensibilidad de precursores CFU-GM, se estudió si este mismo efecto tenía lugar cuando el AM218 era administrado *in vivo*.

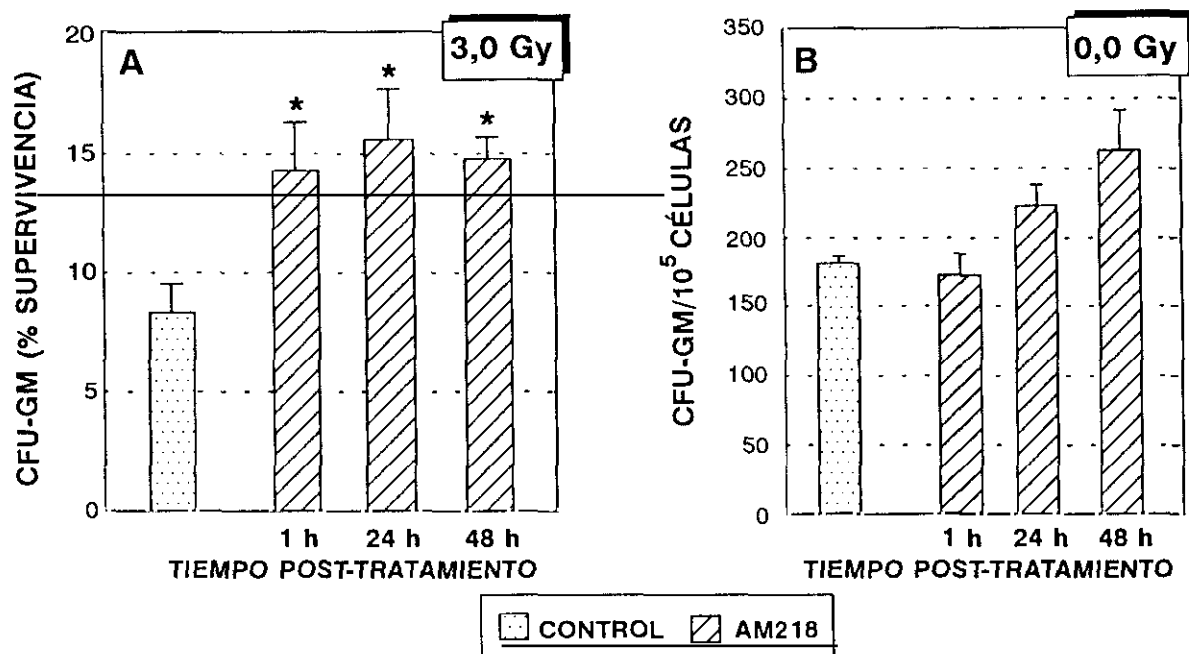
El protocolo utilizado se muestra en la figura 38. Los ratones se trataron *i.v.* con 60 mg/kg de AM218, dosis con capacidad radioprotectora. Distintos tiempos después del tratamiento con AM218 (1, 24 ó 48 horas) los ratones fueron sacrificados, se les extrajo la médula ósea y se preparó una suspensión celular, la cual fue irradiada *in vitro* con una dosis subletal de 3,0 Gy. En este caso, se determinó la supervivencia de precursores hematopoyéticos, tanto comprometidos (CFU-GM), como pluripotentes (CFU-S<sub>12d</sub>). En paralelo, se analizó la radiosensibilidad de los precursores de médula ósea procedente de animales no tratados.



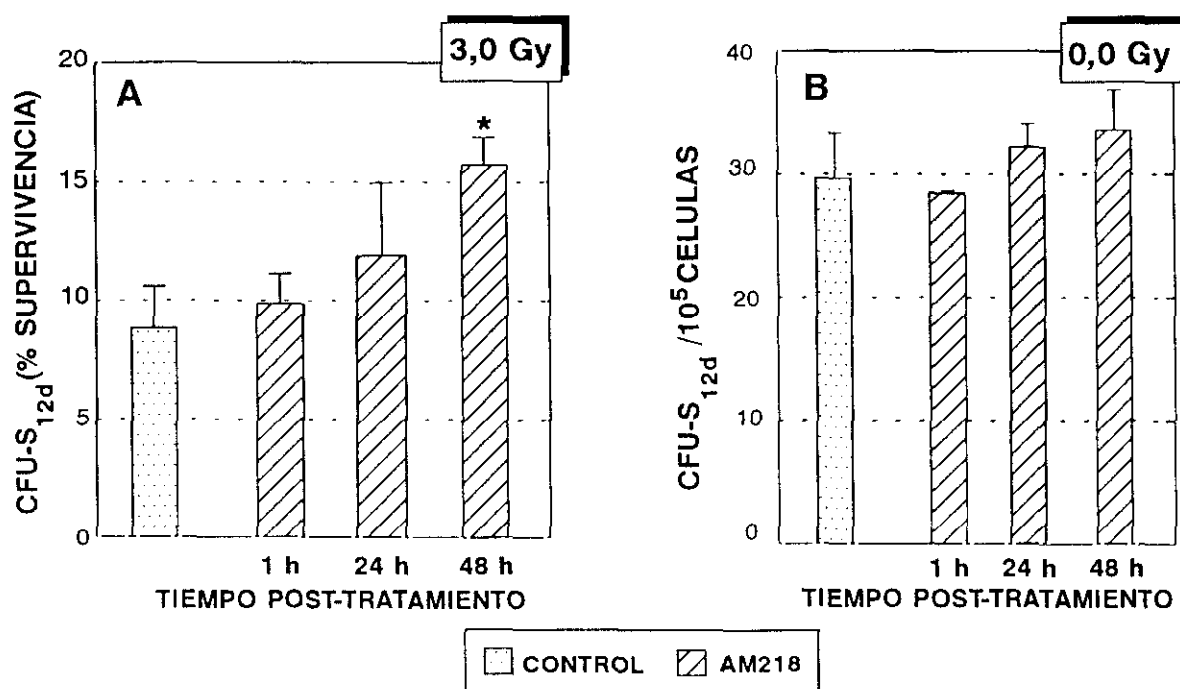
**Figura 38:** Esquema del protocolo utilizado para estudiar la capacidad del tratamiento *in vivo* con AM218 para proteger precursores CFU-GM y CFU-S<sub>12d</sub> del daño inducido por radiaciones ionizantes.

En relación a los precursores CFU-GM, éstos mostraron niveles de supervivencia del 15%, independientemente de que el tratamiento *in vivo* con AM218 se realizara 1, 24 ó 48 horas antes del ensayo, frente al 8% en el grupo control (figura 39).

La radiosensibilidad de los precursores pluripotentes CFU-S<sub>12d</sub> no se vió modificada en los ratones tratados *in vivo* con AM218 1 ó 24 horas antes de la extracción de la médula ósea (10% y 12% respectivamente frente al 8% en la médula ósea control). Sin embargo, ratones tratados con AM218 48 horas antes del ensayo, mostraron CFU-S<sub>12d</sub> menos radiosensibles que las de médula ósea control (15% y 8% respectivamente) (figura 40).



**Figura 39:** Efecto del tratamiento *in vivo* con 60 mg/kg de AM218, (A) sobre la supervivencia de precursores hematopoyéticos CFU-GM en muestras de médula ósea sometidas a una dosis de radiación *in vitro* de 3,0 Gy y (B) sobre el número de precursores hematopoyéticos CFU-GM a distintos tiempos post-tratamiento. \* $p < 0,05$ .



**Figura 40:** Efecto del tratamiento *in vivo* con 60 mg/kg AM218, (A) sobre la supervivencia de precursores CFU-S<sub>12d</sub> en muestras de médula ósea sometidas a una dosis de radiación *in vitro* de 3,0 Gy y (B) sobre el número de precursores hematopoyéticos CFU-S<sub>12d</sub> a distintos tiempos post-tratamiento. \* $p < 0,05$ .

Estos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con el polisacárido AM218, tanto *in vivo* como *in vitro*, disminuye la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos, efecto que es mayor sobre precursores CFU-GM.

#### **4.2.2. Mediadores implicados en los efectos asociados a los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre el sistema hematopoyético**

Teniendo en cuenta el papel fundamental que desempeñan los factores hematopoyéticos en la regulación de los diferentes procesos de proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, nos planteamos determinar hasta qué punto dichos factores están implicados en los efectos producidos por los polisacáridos estudiados sobre el sistema hematopoyético.

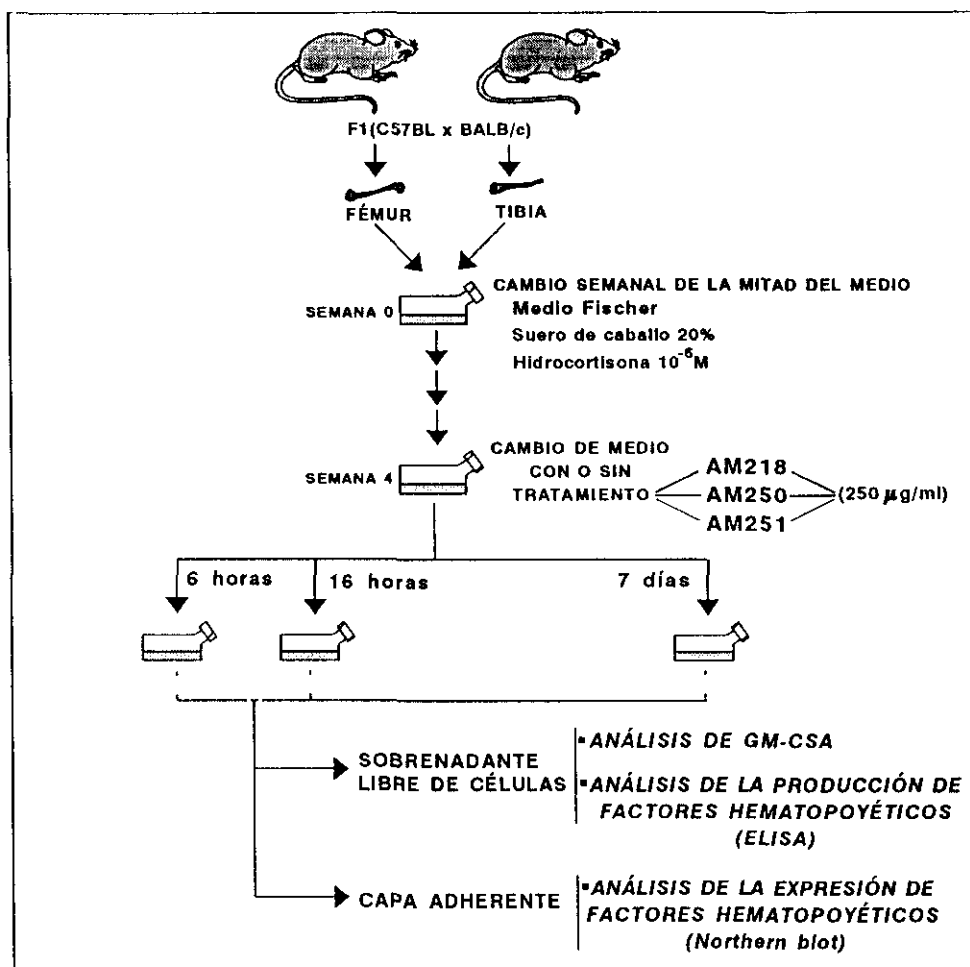
Así, se analizó la capacidad de los polisacáridos para inducir la expresión y/o producción de factores hematopoyéticos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Para ello, se han utilizado varias aproximaciones experimentales:

- **Bioensayos**; permiten determinar la actividad estimuladora de precursores granulo-macrofágicos (GM-CSA).
- **Inmunoensayos enzimáticos (ELISA)**; para cuantificar la producción de factores hematopoyéticos solubles.
- **Northern blot**; para caracterizar el nivel de expresión (ARNm) de diferentes factores hematopoyéticos.

##### **4.2.2.1. Capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para inducir la producción y expresión de factores hematopoyéticos en el LT BMC**

El LT BMC, al reproducir *in vitro* la hematopoyesis medular que tiene lugar *in vivo*, constituye un modelo idóneo para abordar el estudio de expresión y/o producción de factores como consecuencia del tratamiento con dichos polisacáridos (Güenechea y col., 1995). Previamente ya se había mostrado la capacidad de los tres polisacáridos para estimular la hematopoyesis *in vitro*, en el LT BMC (apartado 4.1.2).

El esquema del protocolo utilizado se muestra en la figura 41. A la cuarta semana de cultivo se realizó el tratamiento con 250 µg/ml de AM218, AM250 ó AM251, coincidiendo con el cambio de medio. A esta dosis, los tres polisacáridos producían incrementos a nivel de celularidad y precursores CFU-GM en el sobrenadante, sin modificar el contenido de CFU-GM en la capa adherente (apartado 4.1.2).



**Figura 41:** Esquema del protocolo utilizado para el estudio del efecto del tratamiento *in vitro* con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, sobre la expresión y liberación de factores hematopoyéticos en el LTBMC.

Los análisis se realizaron 6 y 16 horas después del tratamiento, ya que según observaciones previas (Güenechea y col., 1995), la máxima producción de factores hematopoyéticos se detecta a tiempos tempranos después del cambio de medio. El análisis también se realizó a los 7 días del tratamiento, momento en el que se había observado estimulación hematopoyética (apartado 4.1.2).

#### 4.2.2.1.a. Producción de factores hematopoyéticos en el sobrenadante de LTBMCS

Como primera aproximación se determinó la actividad estimuladora de precursores CFU-GM (GM-CSA) en los sobrenadantes recogidos 6, 16 horas y 7 días después del cambio de medio en cultivos controles así como tratados con los distintos polisacáridos (figura 41). Para ello, en el ensayo convencional de cultivo de precursores CFU-GM se ensayaron los sobrenadantes

al 10, 20 ó 30% (v/v), sustituyendo al medio condicionado WEHI-3b.

Los resultados se muestran en la tabla IX. A las 6 horas y 7 días después del cambio de medio no se detectó actividad GM-CSA en los sobrenadantes de los cultivos tratados con cualquiera de los polisacáridos. A las 16 horas del tratamiento con AM250 ó AM251 tampoco se detectó actividad GM-CSA en los sobrenadantes del cultivo. Sin embargo, los sobrenadantes recogidos 16 horas después del tratamiento con AM218 indujeron la formación de colonias CFU-GM cuando eran añadidos al 30% (v/v) en el ensayo.

	+ 6h	+ 16h	+ 7d
Control	0	0	0
AM218	0	28 ± 1	0
AM250	0	0	0
AM251	0	0	0

**Tabla IX: Actividad GM-CSA en sobrenadantes de cultivos controles y tratados con 250 µg/ml de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251.** Los valores representan número de colonias CFU-GM/10<sup>5</sup> células de médula ósea, cuando los sobrenadantes se añadieron al 30% (v/v). Con el medio condicionado de la línea celular WEHI-3b al 15%, el número de CFU-GM/10<sup>5</sup> células es de 200 ± 12.

Al no poder detectar mediante este bioensayo la producción de factores en el sobrenadante de cultivos tratados con estos polisacáridos, se llevaron a cabo inmunoensayos enzimáticos (ELISA), método de elevada sensibilidad y especificidad.

El análisis se realizó a las 16 horas del cambio de medio, momento en el que se había detectado actividad GM-CSA tras el tratamiento con AM218, así como 7 días después del tratamiento para determinar si los factores hematopoyéticos se mantenían en el cultivo. El tratamiento de los LTBMCs consistió, como en experimentos anteriores, en la administración de 250 µg/ml de AM218, AM250 ó AM251 en la cuarta semana de cultivo (figura 41).

Los factores analizados en el sobrenadante mediante ELISA fueron el GM-CSF, IL-1α, IL-3 e IL-6. Las absorbancias obtenidas, tanto con sobrenadantes de LTBMCs control como tratados con los polisacáridos estaban por debajo de los niveles de detección del ELISA.



#### 4.2.2.1.b. Niveles de expresión de factores hematopoyéticos en la capa adherente de LTBMCS

La no detección de factores hematopoyéticos solubles por ELISA no implicaba que éstos no se estuvieran produciendo, por ello se analizó mediante *Northern blot* el efecto de los polisacáridos mencionados sobre la expresión de factores hematopoyéticos.

Siguiendo el protocolo que se muestra en la figura 41, a las 6, 16 horas y 7 días después del tratamiento con 250 µg/ml de los polisacáridos se recogieron las células de la capa adherente, células encargadas de la producción de factores hematopoyéticos (Eliason y col., 1988; Kittler y col., 1992). Posteriormente se extrajo el ARN total de dicha población celular, para el análisis de la expresión de factores hematopoyéticos por *Northern blot* (apartado 3.5.2.2).

En la figura 42 se muestra el *Northern blot* representativo de los realizados con las muestras de ARN obtenidas de la capa adherente de LTBMCS control y tratados. La banda para el ARN ribosómico 7S se utilizó como control del ARN cargado. Como se observa en la figura 42, las diferencias en la expresión de los factores analizados no se deben a una mayor cantidad de ARN cargado en las muestras de los cultivos tratados.

Cuando se utilizó la sonda para detectar ARNm del SCF, apareció fundamentalmente una banda de 6.500 b que correspondía con el ARNm del SCF. Los controles positivos consistieron en ARN de las líneas celulares NIH 3T3 ó C127I estimulada. En la capa adherente de los cultivos control se detectó expresión del SCF ya a las 6 horas, que aumentaba a las 16 horas y se mantenía constante a los 7 días después del cambio de medio. La respuesta en los cultivos tratados era muy similar a los cultivos control, no observándose diferencias en la expresión del SCF como consecuencia del tratamiento con los polisacáridos.

Para el M-CSF se utilizó como control positivo ARN de la línea celular L929. En todas las muestras se observan bandas de 4.500 b que corresponden con el ARNm para el M-CSF. Tanto en los cultivos control como en los tratados, la expresión del M-CSF era máxima 6 horas después del cambio de medio y se mantenía hasta 7 días, aunque a niveles más bajos. El tratamiento con los tres polisacáridos produjo incrementos en la expresión del M-CSF a las 6 horas del tratamiento.

En la siguiente hibridación se utilizó una sonda para la IL-1α y como control positivo, ARN total de la línea celular P388.D<sub>1</sub> que generó una banda de 2.200 b correspondiente al transcrito de la IL-1α. Esta misma banda apareció en todas las muestras de ARN procedentes de la capa adherente de LTBMCS. En los cultivos sin tratar, la expresión de la IL-1α resultó máxima a las 16 horas del cambio de medio, mientras que los cultivos tratados con cualquiera de los polisacáridos muestran la máxima expresión de la IL-1α a las 6 horas, estando dicha expresión aumentada respecto a los cultivos control.

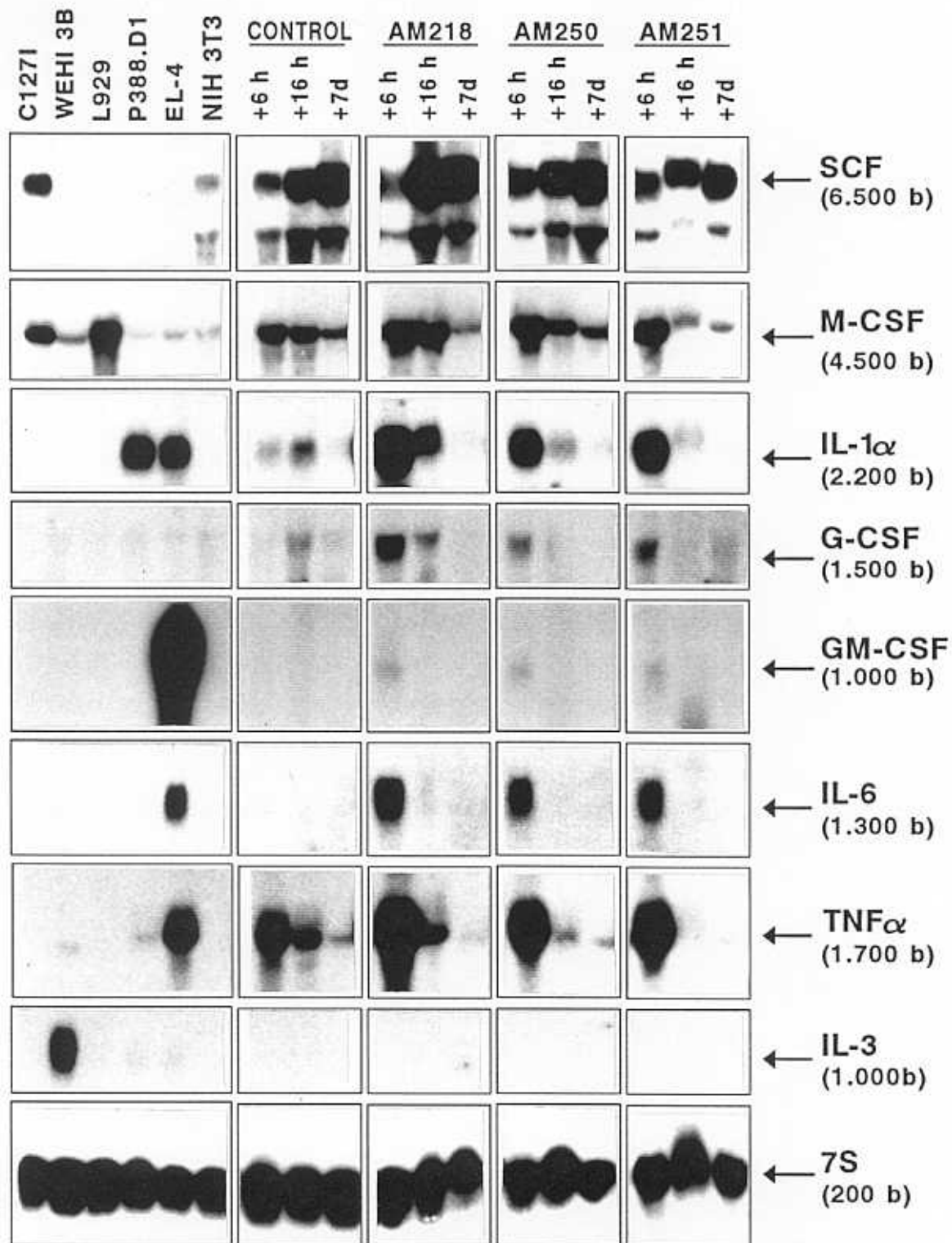
Con la sonda del **G-CSF** apareció una banda débil de 1.500 b en la muestra utilizada como control positivo, que consistió en ARN total de la línea celular EL-4 estimulada. En las muestras control, se observa expresión del G-CSF a las 16 horas, que se mantiene a los 7 días del cambio de medio aunque a niveles más bajos. Los cultivos tratados mostraron una expresión del G-CSF muy aumentada a las 6 horas del tratamiento respecto a los cultivos control.

La sonda para el **GM-CSF** originó una banda muy intensa de 1.000 b en la muestra de la línea celular EL-4 estimulada. No se detectó expresión del GM-CSF en las muestras control, mientras que en las muestras de ARN extraídas a las 6 horas del tratamiento con los polisacáridos se observó expresión del GM-CSF (bandas tenues), no detectándose a tiempos posteriores en ninguna de las muestras.

Para la **IL-6** se utilizó como control positivo ARN de la línea celular EL-4 estimulada, originándose una banda a 1.300 b que corresponde con el tamaño del ARNm descrito para la IL-6. En las muestras control no se detectó expresión de IL-6, mientras que en las muestras de ARN extraídas a las 6 horas del tratamiento con los polisacáridos se detectó expresión de la IL-6, que no se detectaba a tiempos posteriores en ninguna de las muestras.

Con una sonda para el **TNF $\alpha$** , en la línea celular EL-4 (control positivo) se observó una banda de 1.700 b (tamaño del ARNm del TNF $\alpha$ ). Esta misma banda apareció en las muestras tanto controles como de cultivos tratados, siendo la máxima expresión del TNF $\alpha$  a las 6 horas, que se mantiene a niveles más bajos hasta los 7 días. En las muestras procedentes de cultivos tratados, la expresión del TNF $\alpha$  a las 6 horas se vio aumentada con los tres polisacáridos con respecto a los cultivos control.

También se realizó una hibridación con la sonda para la **IL-3**, no observándose expresión de ésta en ninguna de las muestras, excepto en la línea WEHI-3b, utilizada como control positivo.

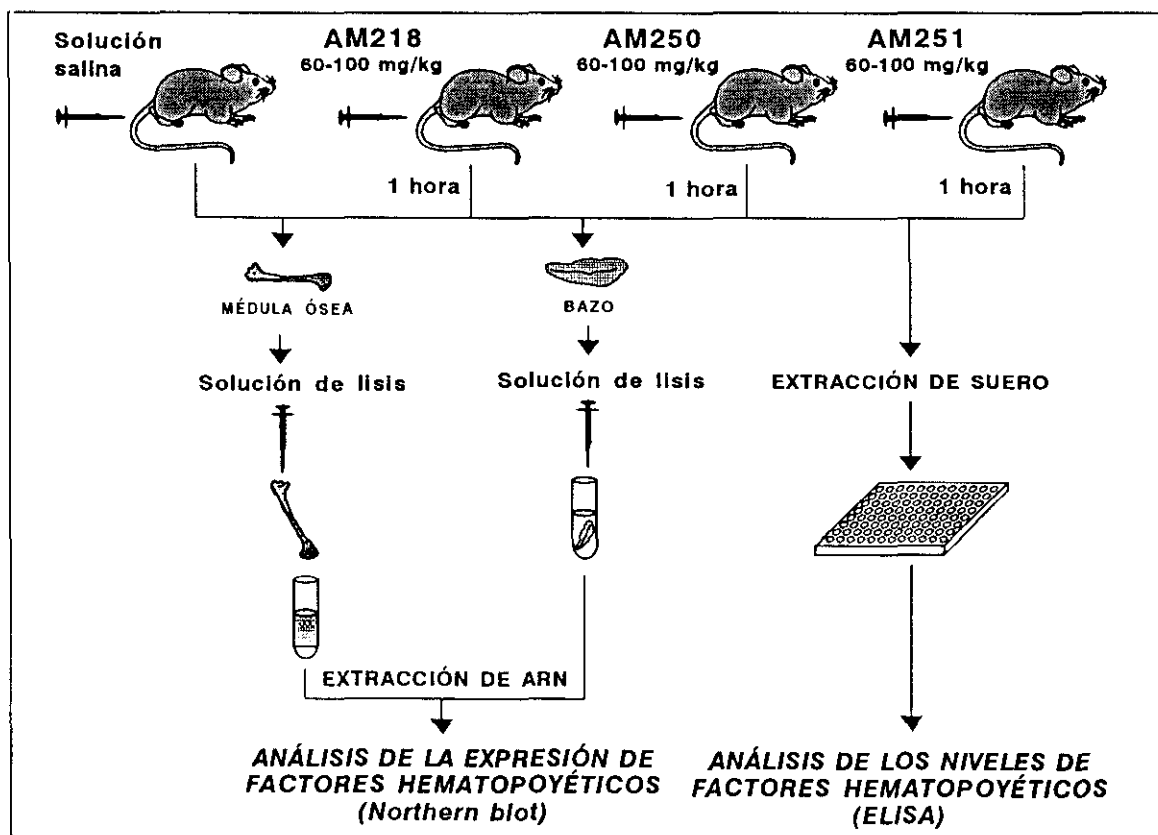


**Figura 42:** Análisis por *Northern blot* de la expresión de factores hematopoyéticos en la capa adherente de LTBMCs. El ARN se extrajo a las 6, 16 horas y 7 días del cambio de medio con o sin tratamiento con 250  $\mu\text{g/ml}$  de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251. Como controles positivos se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de ARN total de las líneas celulares WEHI-3b, NIH 3T3, L929, P388.D1, C1271 y EL-4, estas dos últimas se estimularon durante 24 horas con 50nM de forbol dibutirato. Del resto de las muestras se cargaron 25  $\mu\text{g}$  de ARN total.

En resumen, los resultados muestran que como consecuencia del tratamiento con 250  $\mu\text{g/ml}$  de los polisacáridos AM218, AM250 ó AM251, 6 horas después del cambio de medio y en la capa adherente de los LTBMCS se detecta expresión del GM-CSF y se aumenta y/o adelanta el máximo de expresión del M-CSF, IL-1 $\alpha$ , G-CSF, IL-6 y TNF $\alpha$ . Entre los distintos polisacáridos, el patrón de expresión de los distintos factores hematopoyéticos en el LTBMC fue muy semejante.

#### 4.2.2.2. Capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para inducir la expresión y producción de factores hematopoyéticos *in vivo*

Una vez descrito el efecto que la administración *in vitro* de los polisacáridos tenía sobre la expresión y producción de factores hematopoyéticos en el LTBMC y con objeto de confirmar si este efecto se reproducía *in vivo*, se estudió la capacidad de dichos polisacáridos para modular la expresión y producción de factores hematopoyéticos cuando eran administrados a ratones no sometidos a irradiación.



**Figura 43:** Protocolo para el estudio del efecto del tratamiento *in vivo* con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 sobre la expresión de factores hematopoyéticos en médula ósea y bazo de ratones normales, y su liberación en suero.

El protocolo seguido para este estudio se muestra en la figura 43. El análisis de expresión y producción de factores se llevó a cabo 1 hora después del tratamiento *in vivo* con los distintos polisacáridos. Las dosis de polisacárido utilizadas fueron de 60 y 100 mg/kg, dosis óptimas utilizadas en ensayos previos. Así, 1 hora después del tratamiento se extrajo la médula ósea y el bazo de un mínimo de 5 ratones por lote, para proceder al análisis de la expresión de factores hematopoyéticos en esos órganos por *Northern blot*. De esos mismos grupos de ratones se obtuvieron muestras de suero, en las que se analizarían los niveles de factores hematopoyéticos solubles mediante ELISA. De forma paralela se extrajo ARN de médula ósea y bazo de un grupo de ratones no tratados, así como el suero.

#### 4.2.2.2.a. Niveles de expresión de factores hematopoyéticos en la médula ósea y el bazo

Los *Northern blots* realizados con las muestras de ARN obtenidos de médula ósea y bazo de ratones control y tratados con 60 ó 100 mg/kg de AM218, AM250 ó AM251, se muestran en la figura 44. La banda para el ARN ribosómico 7S, se utiliza como control del ARN cargado.

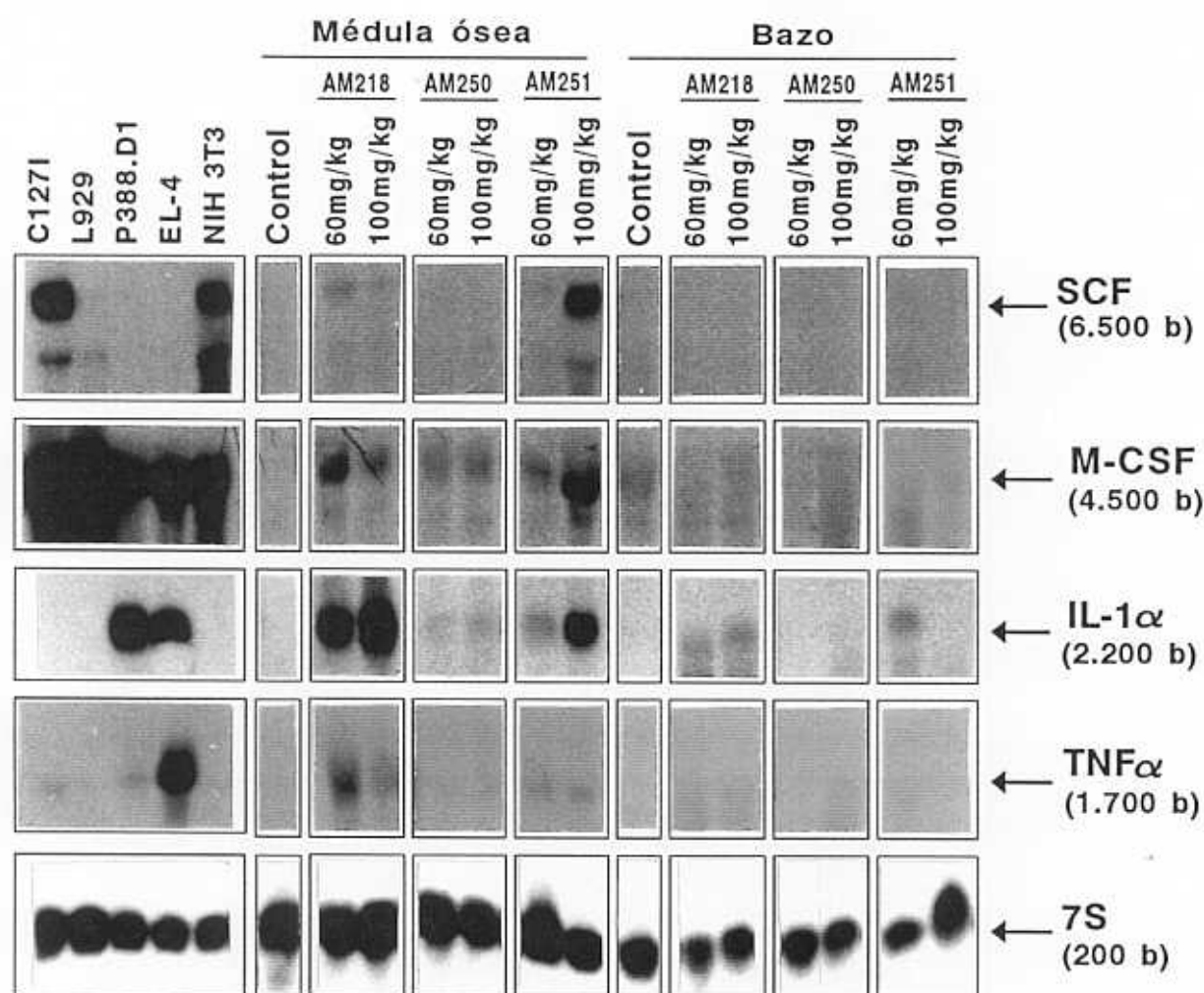
Cuando se utilizó la sonda para detectar ARNm del SCF, en las muestras de médula ósea y bazo control no se detectó expresión y sin embargo sí se detectó en las muestras de médula ósea de ratones tratados. Este aumento de la expresión respecto a la médula ósea control era casi indetectable (bandas muy tenues) cuando los ratones eran tratados con los polisacáridos AM250 y AM218. El nivel máximo de expresión del SCF se obtuvo en la médula ósea de ratones tratados con 100 mg/kg de AM251 (figura 44). En el bazo de ratones tratados no se detectó expresión del SCF.

En la médula ósea de los ratones control no se detectó la banda de ARNm correspondiente al M-CSF, sin embargo, en todas las muestras de médula ósea de ratones tratados con polisacáridos se detectó expresión del M-CSF. Esta expresión era menor en los ratones tratados con AM250, mientras que con los polisacáridos AM218 y AM251 la expresión del M-CSF era más patente. En las muestras de bazo, la expresión del M-CSF era muy baja, observándose unas bandas muy tenues, tanto en muestras control como tratadas.

En la siguiente hibridación se utilizó una sonda para la IL-1 $\alpha$  que generó una banda de 2.200 b que no se detectó en médula ósea control, mientras que sí se detectaba en todas las muestras de médula ósea procedentes de ratones tratados con los polisacáridos. Se produjo un fuerte aumento de la expresión de IL-1 $\alpha$  en los ratones tratados con AM218 (bandas muy intensas con ambas dosis de polisacárido) y AM251 (mayor expresión con la dosis de 100 mg/kg). Con el polisacárido AM250 aumentó en menor medida la expresión de la IL-1 $\alpha$  en médula ósea, siendo igual la respuesta con ambas dosis. En bazo control, no se detectó expresión de la IL-1 $\alpha$ , mientras que sí se observó expresión en el bazo de ratones tratados

con los polisacáridos AM218 y AM251. Con el polisacárido AM250 la expresión de la IL-1 $\alpha$  en bazo era prácticamente indetectable.

Con la sonda del TNF $\alpha$ , no se detectó expresión en las muestras control de médula ósea y bazo. En los ratones tratados con los polisacáridos se detectaba expresión del TNF $\alpha$  en la médula ósea. Ambas dosis de AM218 produjeron aumento de la expresión del TNF $\alpha$ . Este aumento era menor tras el tratamiento con los polisacáridos AM250 ó AM251, siendo prácticamente indetectable (bandas muy tenues). En el bazo de los ratones tratados no se detectó expresión del TNF $\alpha$  con ninguno de los polisacáridos.



**Figura 44:** Análisis por *Northern blot* de la expresión de factores hematopoyéticos en médula ósea y bazo 1 hora después del tratamiento con 60 ó 100 mg/kg de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251. Como control positivo se cargaron 20  $\mu$ g de ARN total de las líneas NIH 3T3, P388.D<sub>1</sub>, L929, C127I y EL-4, estas dos últimas se estimularon durante 24 horas con 50nM de forbol dibutirato. Del resto de las muestras se cargaron 25  $\mu$ g de ARN total.

También se realizaron hibridaciones con sondas para la IL-3, IL-6, G-CSF y GM-CSF, no observándose expresión de estos factores hematopoyéticos en ninguna de las muestras (datos no mostrados).

Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de los tres polisacáridos para incrementar en 1 hora la expresión de al menos el SCF, IL-1 $\alpha$ , M-CSF y TNF $\alpha$  en médula ósea y de IL-1 $\alpha$  en bazo. Esta inducción de expresión fue menor para el polisacárido AM250 respecto al AM218 ó AM251.

#### 4.2.2.2.b. Niveles de factores hematopoyéticos en el suero

De forma paralela al análisis de la expresión de factores hematopoyéticos en médula ósea y bazo se analizó si esta expresión aumentada de factores hematopoyéticos se correspondía con su presencia aumentada en el suero de los mismos ratones.

El análisis se realizó mediante ELISA en el suero de ratones tratados 1 hora antes con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251. La dosis administrada fue de 100 mg/kg (figura 43).

Los resultados se muestran en la tabla X. Los niveles de IL-1 $\alpha$  e IL-3 detectados en el suero de los ratones tanto control como tratados con los polisacáridos estaban en el límite de detección del ELISA utilizado en el ensayo, por lo que no es posible establecer diferencias en la concentración de IL-1 $\alpha$  e IL-3 entre sueros de ratones control y tratados con los polisacáridos.

	GM-CSF	IL-6
CONTROL	1,8	-
AM218	10,1	11.293,0
AM250	10,3	5.181,0
AM251	11,0	-

**Tabla X:** Niveles de factores hematopoyéticos (pg/ml) en suero de ratones control y tratados 1 hora antes con 100 mg/kg de los polisacáridos AM218, AM250 o AM251.

En suero de ratones control, el nivel de GM-CSF era inferior al límite de detección del ELISA para este factor (5 pg/ml). Sin embargo, en el suero de ratones tratados con AM218, AM250 y AM251 se detectaron niveles de GM-CSF del orden de 10 pg/ml (tabla X).

En cuanto a la IL-6, el tratamiento con los polisacáridos AM218 y AM250 produjo un fuerte aumento en la producción de IL-6 como se observa en la tabla X (11.000 y 5.000 pg/ml respectivamente). De nuevo, en los sueros controles, los niveles de IL-6 estaban por debajo de los límites de detección del ELISA, al igual que los ratones tratados con AM251.

Estos resultados ponen de manifiesto que como consecuencia del tratamiento con cualquiera de los polisacáridos hay un aumento moderado en los niveles de GM-CSF y una fuerte subida de IL-6 en el suero de ratones tratados con AM218 y AM250.



## **DISCUSIÓN**

La alta sensibilidad del sistema hematopoyético a las radiaciones ionizantes conlleva a una aplasia de la médula ósea en pacientes sometidos a tratamientos antitumorales de radioterapia. Debido a esto, para prevenir la muerte por síndrome de la médula ósea, los protocolos de radioterapia se tienen que reducir o incluso suspender. La protección y/o estimulación del sistema hematopoyético son los principales objetivos para contrarrestar los efectos adversos de dichos tratamientos, permitiendo una intensificación de las terapias, haciéndolas más eficaces (Guigon y col., 1982; Lord y Wright, 1982; Testa y Dexter, 1989; Graham y col., 1990; Glaspy y Golde, 1990; Moore, 1991). Esta misma problemática se plantea en los accidentes radiológicos donde la disfunción hematopoyética es una de las causas de muerte cuando el individuo recibe dosis moderadas de radiación.

La disponibilidad de factores hematopoyéticos en forma recombinante ha permitido realizar estudios exhaustivos sobre esta problemática, los cuales han mostrado que estas proteínas son eficaces en reconstituir la hematopoyesis de pacientes mielosuprimidos por tratamientos antitumorales (Bronchud y col., 1987; Antman y col., 1988; Testa y Dexter, 1989) y en recuperar el síndrome hematopoyético en personas expuestas a una irradiación accidental (Butturini y col., 1988).

Aunque la administración de factores hematopoyéticos es la principal estrategia para prevenir la pancitopenia producida después de un tratamiento mielosupresor, otras moléculas que puedan actuar induciendo la producción endógena de esos factores hematopoyéticos también podrían ser unos buenos estimuladores hematopoyéticos. Además, esta estrategia produciría una liberación más fisiológica de los factores, los cuales actuarían sinérgicamente para estimular la proliferación de precursores hematopoyéticos.

Desde hace varias décadas se han descrito una gran variedad de moléculas de naturaleza polisacarídica como agentes inmunomoduladores, a los que además se les han adscrito una serie de acciones sobre el sistema hematopoyético, actuando a su vez como radioprotectores (Patchen y McVittie, 1985; Brines, 1993; Hadden, 1993). Así, gracias al desarrollo de la glicobiología y biotecnología, los hidratos de carbono se han reconocido como moléculas que tienen un gran potencial de aplicación en clínica (Pivel y Muñoz, 1994).

Sobre esta problemática se ha centrado esta memoria, cuyo objetivo principal radica en evaluar la capacidad radioprotectora de tres moléculas de naturaleza polisacarídica en situaciones de mielosupresión inducidas por las radiaciones ionizantes, así como profundizar en los mecanismos de acción de dichas moléculas.

## 5.1. ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE RATONES NORMALES INDUCIDA POR LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251

Para alcanzar el objetivo propuesto, la aproximación más directa podría ser utilizar un modelo de ratones sometidos a irradiación, es decir, mielosuprimidos, al ser ésta la situación en la que dichos polisacáridos tienen una potencial aplicación. Sin embargo, como primera aproximación, el modelo de ratones irradiados lleva asociado un número elevado de variables experimentales (tipo y dosis de radiación, pauta de administración de los polisacáridos, parámetro y momento idóneo de análisis, etc) que le hacen un modelo demasiado complejo para la determinación del efecto estimulador de estos polisacáridos sobre el sistema hematopoyético.

La otra alternativa para llevar a cabo estos primeros estudios sobre los efectos de los polisacáridos en la hematopoyesis murina, era utilizar un modelo de ratones normales, es decir, no mielosuprimidos. El estudio en ratones normales ofrece diversas ventajas frente al modelo de ratones irradiados, entre las que cabe destacar: mayor simplicidad, al intervenir un menor número de variables experimentales y mayor reproducibilidad en la respuesta al tratamiento. Además, es importante tener en cuenta que tanto datos de la literatura, como resultados obtenidos en el laboratorio con moléculas de naturaleza similar a los polisacáridos objeto de estudio, ponen de manifiesto que el modelo de ratones normales es un buen indicador de la capacidad radioprotectora asociada a los compuestos (Gallicchio y col., 1984; Patchen y col., 1987; Real y col., 1992).

Así, en base a lo comentado anteriormente, se decidió utilizar un ensayo en ratones normales para caracterizar la actividad de estos polisacáridos sobre el sistema hematopoyético.

Una vez seleccionado el modelo experimental, era necesario fijar las diferentes variables asociadas al ensayo, con objeto de simplificar al máximo el estudio. Así, basándonos fundamentalmente en la experiencia adquirida en el laboratorio con compuestos de naturaleza polisacárido-proteína (Real, 1991), el ensayo quedó definido como *análisis del efecto estimulador sobre precursores comprometidos de médula ósea y bazo de ratones normales, 5 días después del tratamiento i.v. con una única dosis de polisacárido*.

Utilizando este ensayo se estudió la estimulación hematopoyética provocada por los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, administrados i.v. en un rango de dosis de 20 a 100 mg/kg (apartado 4.1.1.).

Ninguno de los tres polisacáridos mostró capacidad estimuladora cuando se administraba a dosis menores de 60 mg/kg, ni en médula ósea ni en bazo de ratones normales. Las dosis de polisacárido activa para estimular la hematopoyesis esplénica estaban en el rango de 60 a 100 mg/kg, dependiendo del polisacárido ensayado. Así, mientras que el AM251 fue activo a

partir de 60 mg/kg, el AM218 mostró actividad con dosis iguales o superiores a 80 mg/kg, mientras que el AM250 sólo mostró efecto cuando era administrado a 100 mg/kg. Con ninguno de los polisacáridos se observó una relación lineal entre dosis administrada y efecto estimulador provocado.

A la dosis máxima ensayada, 100 mg/kg, si bien los tres polisacáridos provocaron un aumento significativo en el contenido de CFU-GM en bazo, el grado de estimulación varió en función del polisacárido. A esta dosis, los polisacáridos AM218 y AM251 también provocaron un aumento significativo en el contenido de precursores BFU-E en bazo, mientras que en ratones tratados con 100 mg/kg de AM250 no se observaron diferencias significativas respecto al control en el contenido de BFU-E en bazo, 5 días post-tratamiento. En relación a la celularidad esplénica, no se observaron diferencias significativas respecto a los valores control con ninguno de los polisacáridos, a ninguna de las dosis ensayadas.

Estos resultados demostraban la capacidad de los tres polisacáridos para estimular la hematopoyesis esplénica en ratones normales. En estos estudios también es destacable el hecho de que el tratamiento con los polisacáridos no provoca un aumento en el contenido de precursores granulo-macrofágicos a expensas de una disminución en el número de precursores eritroides, es decir, no se produce una descompensación entre líneas de diferenciación. Este tipo de fenómeno se ha observado en la médula ósea de ratones tratados con sales de litio o con rG-CSF a dosis altas (250 µg/día), en donde se observa un aumento en la granulopoyesis a expensas de la producción de eritrocitos (Gallicchio y Chen, 1980; Molineux y col., 1990).

Los estudios realizados *in vivo* en ratones normales, mostraban asimismo que la celularidad y el contenido de precursores hematopoyéticos en la médula ósea no se incrementaba como consecuencia del tratamiento con ninguno de los polisacáridos. Sin embargo, ésto no descartaba que los polisacáridos tuvieran efecto sobre este órgano hematopoyético. La médula ósea, al estar localizada en el interior del hueso, posee una capacidad muy limitada de expansión, lo que conlleva una imposibilidad para acumular altos números de precursores. Así, cuando la hematopoyesis medular es estimulada, los precursores tienden a migrar al torrente circulatorio, acumulándose en otros órganos como el bazo, fenómeno conocido como *movilización*. Este fenómeno ha sido descrito en ratones normales para una gran variedad de productos. Entre ellos cabe destacar algunos factores de crecimiento hematopoyético recombinantes, como el G-CSF (Pojda y col., 1990), IL-3 (Lord y col., 1986; Kindler y col., 1986) o el SCF (Molineux y col., 1991), y otros productos de diversa naturaleza como el complejo polisacárido-proteína AM5 (Real y col., 1992), el glucano-P (Patchen y McVittie, 1986a) ó el extracto de *Shigoka* (Miyanomae y Frindel, 1988).

Utilizando el cultivo de larga duración de médula ósea, sistema que reproduce con gran fidelidad la hematopoyesis que tiene lugar *in vivo* en la médula ósea (Dexter y col., 1977),

se estudió si los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 tenían un efecto estimulador sobre la hematopoyesis medular, el cual está enmascarado *in vivo* por fenómenos de movilización.

En los LTBMCS, a diferencia de lo que ocurre en los ensayos clonogénicos convencionales realizados en medio semisólido, se desarrolla una hematopoyesis activa por largos períodos de tiempo, teniendo lugar procesos de automantenimiento, diferenciación y proliferación de precursores hematopoyéticos. Así, en estos cultivos no sólo se puede determinar la existencia o no de efecto estimulador asociado al polisacárido, sino que representan un sistema idóneo para caracterizar en detalle dicho efecto. Además, por la propia naturaleza del cultivo, el efecto estimulador del polisacárido no podrá verse enmascarado por fenómenos de migración de precursores.

El tratamiento *in vitro* de LTBMCS con cualquiera de los polisacáridos a dosis comprendidas entre 50 y 250  $\mu\text{g/ml}$ , provocó un aumento significativo en el contenido de células y precursores CFU-GM en el sobrenadante de los cultivos, sin que se observaran diferencias entre los efectos producidos por AM218, AM250 y AM251 (apartado 4.1.2.).

En la capa adherente de los LTBMCS, el tratamiento con estos polisacáridos produjo un aumento significativo en el contenido de células con respecto a los controles, aumentos que fueron menores a los descritos para el sobrenadante de esos mismos cultivos. El contenido de precursores CFU-GM en la capa adherente no se vió modificado en los cultivos tratados con los polisacáridos, a las dosis ensayadas, respecto a los cultivos control.

No se observaron diferencias entre los polisacáridos en cuanto a su efecto estimulador en cultivos de larga duración. Con todos ellos se mantuvieron constantes los niveles de precursores CFU-GM en la capa adherente del cultivo, mientras que aumentaron en el sobrenadante. La organización de la hematopoyesis en el LTBMCS explicaría el efecto diferencial entre sobrenadante y capa adherente, ya que es en la capa adherente en donde se encuentran los nichos hematopoyéticos, focos de elevada actividad hematopoyética, en donde se localizan fundamentalmente precursores muy indiferenciados, células madre, que a medida que van proliferando y diferenciando van siendo liberados al sobrenadante del cultivo.

Esta organización del LTBMCS, si bien explica el efecto de los polisacáridos sobre el compartimento de precursores CFU-GM, no explicaría el aumento de células totales observado en la capa adherente. A este respecto, hay que tener en cuenta que la capa adherente está constituida por una gran diversidad de poblaciones celulares, no sólo hematopoyéticas, sino también estromales. Así, el aumento de la celularidad observado en la capa adherente de los cultivos tratados sería debido al aumento de otras poblaciones diferentes a las CFU-GM. En base a datos de la literatura y del laboratorio cabe pensar que el aumento en la celularidad de la capa adherente no es consecuencia de un aumento en el contenido de precursores más indiferenciados como la CFU-S, ya que esos compartimentos

suelen estimularse en menor medida que los precursores CFU-GM (Levitt y Quesenberry, 1980; Güenechea y col., 1995). Por otro lado, tampoco es probable que se trate de precursores de la línea eritroide, ya que en el cultivo de larga duración la eritropoyesis está muy limitada (Dexter y col., 1981). Así, el aumento de células en la capa adherente es probable que sea consecuencia de la estimulación de poblaciones celulares del estroma (células endoteliales, fibroblastos, etc) o bien de células hematopoyéticas más diferenciadas que los precursores CFU-GM y que todavía no se habrían liberado al sobrenadante (Dexter y col., 1984a).

Se han descrito en la literatura diversos compuestos con un efecto semejante al de los polisacáridos estudiados, ya que son capaces de estimular la hematopoyesis medular en LT BMCs, a pesar de no mostrar efecto estimulador sobre la hematopoyesis de la médula ósea *in vivo*. Así, mientras que el tratamiento *in vivo* con factores hematopoyéticos como la IL-3 o el SCF, o con compuestos de naturaleza polisacárido-proteína como el AM5, no conlleva un aumento en el contenido de precursores hematopoyéticos en la médula ósea de los ratones (Kindler y col., 1986; Molineux y col., 1991; Real y col., 1992), estos compuestos sí tienen efecto sobre la hematopoyesis medular como se pone de manifiesto en los estudios llevados a cabo *in vitro* en LT BMCs (Eliason y col., 1988; Dunlop y col., 1993; Güenechea y col., 1995).

Quedaba así demostrado que los tres polisacáridos son capaces de estimular la hematopoyesis medular, si bien este efecto no era detectable *in vivo* debido probablemente a fenómenos de migración de precursores a sangre periférica y a otros órganos hematopoyéticos como el bazo. Además, de los estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, se demuestra que no existen grandes diferencias entre los efectos estimuladores de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, excepto en el rango de dosis activas cuando son administrados *in vivo* a ratones normales.

## 5.2. RADIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251

Habiéndose demostrado la capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para estimular la hematopoyesis en situaciones de normalidad del sistema, se pasó a caracterizar la capacidad radioprotectora de éstos en un modelo de ratones irradiados con dosis que provocan la muerte del animal por síndrome de la médula ósea.

Para estos estudios, el parámetro a analizar fue la supervivencia del animal, al ser éste uno de los ensayos más sencillos que se pueden llevar a cabo en ratones irradiados, siendo además un buen indicador de la capacidad radioprotectora del compuesto. En los estudios de

supervivencia, los ratones son irradiados con dosis potencialmente letales, dosis que provocan un fuerte daño en el sistema hematopoyético, de tal manera que si el animal no recibe un tratamiento de apoyo muere como consecuencia del síndrome hematopoyético en un período no superior a 30 días. Si el tratamiento con los polisacáridos tiene un efecto beneficioso sobre la hematopoyesis, los ratones irradiados con dosis potencialmente letales sobrevivirán a la irradiación.

En general, las dosis de radiación empleadas en estudios de supervivencia se encuentran en un rango de  $LD_{80/30}$ - $LD_{100/30}$ , es decir, dosis que provocan la muerte del 80 ó el 100% de los animales en 30 días desde la irradiación. La dosis que se ha empleado en los estudios de supervivencia realizados con estos polisacáridos fue de 7,6 Gy, dosis con la que no se supera el 20% de supervivencia en ratones control.

En los ensayos de supervivencia, además de la dosis de radiación, la pauta de administración del polisacárido en relación con la exposición a la radiación, es una variable que va a influir de manera decisiva en el efecto radioprotector observado. Así, para cada uno de los polisacáridos analizados se ensayaron diferentes pautas de administración, tanto pre-irradiación como post-irradiación (apartado 4.1.3.1).

Los resultados de estos estudios pusieron de manifiesto que los tres polisacáridos son unos potentes radioprotectores. Así, la supervivencia de ratones irradiados con una dosis potencialmente letal aumentó significativamente respecto al control cuando los ratones se trataron con estos polisacáridos 1 hora antes de la irradiación, con porcentajes de supervivencia del 82-96% en los ratones tratados frente a un 10% en los ratones control irradiados. No se observaron diferencias entre la capacidad radioprotectora del AM218, AM250 y AM251. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de supervivencia de ratones tratados con 60 mg/kg y 100 mg/kg de cualquiera de los polisacáridos.

El tratamiento con dichos polisacáridos 1 día antes de la irradiación también supuso aumentos significativos en la supervivencia respecto al lote control irradiado. Si bien con esta pauta de administración los porcentajes de supervivencia eran menores que los obtenidos cuando los polisacáridos eran administrados 1 hora antes de la irradiación, sólo en el caso del AM218 estas diferencias eran significativas. Cuando el tratamiento con AM218 se llevó a cabo 5 ó 3 días antes de la irradiación, la supervivencia de los ratones tratados no se modificaba respecto a la de controles irradiados. El tratamiento con los polisacáridos después de la irradiación (1 hora ó 1 día) tampoco mejoraba la supervivencia de los ratones.

Estos resultados confirman el hecho de que la pauta de administración de un producto en relación con el momento de la irradiación es crítica para el efecto radioprotector producido por el compuesto. Así, los tres polisacáridos administrados hasta 1 día antes de la irradiación tienen una elevada capacidad radioprotectora, mientras que cuando el tratamiento se distancia

del momento de la irradiación, dichos polisacáridos no tienen capacidad para mejorar la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales. Asimismo, la administración de cualquiera de los polisacáridos después de la irradiación no mostró capacidad para aumentar la supervivencia de esos animales.

La mayoría de los compuestos radioprotectores descritos en la literatura, son activos cuando se administran antes de la irradiación y en concreto entre 1 día y el momento de la irradiación. Entre los compuestos con actividad radioprotectora cuando son administrados 1 día antes de la irradiación, cabe destacar al lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Ainsworth y Hatch, 1960), el glucano-P (Patchen y col., 1986b), el extracto de Shigoka (Miyanomae y Frindel, 1988), el complejo polisacárido-proteína AM5 (Real y col., 1992) y el muramil tripéptido MTP-PE-MLV (Federocko, 1994), los cuales producen aumentos de la supervivencia entre el 60 y el 90% frente a supervivencias de 0-30% en ratones no tratados irradiados con dosis potencialmente letales. Además de estos compuestos, varios factores hematopoyéticos recombinantes muestran actividad radioprotectora cuando son administrados en dosis únicas 1 día antes de la irradiación. Así, el tratamiento con IL-1 $\alpha$  (Neta y col., 1986), TNF $\alpha$  (Neta y col., 1988a), G-CSF (Uckun y col., 1990) o SCF (Zsebo y col., 1992) permiten que entre el 50 y el 88% de los ratones sobrevivan a dosis potencialmente letales de radiación, mientras que la supervivencia de los ratones no tratados no superaba el 8%.

Otros compuestos han mostrado capacidad radioprotectora cuando se administran a tiempos más tempranos antes de la irradiación. Entre éstos, varios polisacáridos poliglucanos (GLP/B04, GLP/B05) y un polimanano Rhodexmano (MNR), que aumentan la supervivencia de ratones irradiados con una dosis potencialmente letal desde un 0-10% en los controles hasta un 100% cuando se administraban 1 hora ó 15 minutos antes de la irradiación (Maisin y col., 1986). El aminotiol WR-2721 (Maisin y col., 1993) y el antagonista del calcio, Diltiazem (Floersheim, 1993), también muestran capacidad radioprotectora al administrarse 30 minutos antes de la irradiación (100% de supervivencia con ambos compuestos frente a un 0% en los controles irradiados).

Como en el caso de los polisacáridos analizados, todos los compuestos descritos anteriormente pierden la capacidad radioprotectora a medida que su tratamiento se distancia del momento de la irradiación. Excepcionalmente, el dextrano sulfatado (DS500) muestra cierta capacidad radioprotectora cuando se administraba 3 días antes de la irradiación (supervivencias del 92% respecto al 72% en el grupo control) (Ross y Peeke, 1986a; 1986b).

Así mismo, esos compuestos pierden o ven muy reducida su capacidad radioprotectora cuando se administran después de la irradiación. Entre los productos con actividad radioprotectora cuando son administrados post-irradiación se encuentran el glucano-F que permite que un 10% de los animales sobrevivan cuando se administra 1 hora después de la irradiación frente al 0% en los controles irradiados (Patchen y McVittie, 1986b), extractos naturales de plantas



medicinales como el extracto de Shigoka que administrado 15 minutos después de la irradiación aumenta la supervivencia desde un 0% en los controles hasta un 40% (Miyanomae y Frindel, 1988) o el LPS administrado a las 2 horas de la irradiación, con un aumento de la supervivencia del 70% respecto al 29% en los controles (Ainsworth y Hatch, 1960).

Hasta el momento, se han descrito pocos compuestos cuya capacidad radioprotectora sea mayor al administrarse después de la irradiación. Entre ellos, se encuentra el (II)2 (3,5-diisopropilsalicilato)4 cúprico (Sodelberg y col., 1990) o el *Lactobacillus casei* inactivado por calor (LC9018) (Nomoto y col., 1991), que administrados después de la irradiación producen un aumento de la supervivencia del 78 y 100% respectivamente, frente al 40 y 20% de supervivencia en los controles irradiados. El rG-CSF también es un radioprotector activo cuando se administra post-irradiación (50% de supervivencia respecto a un 20% en los controles), si bien hay que tener en cuenta que para que sea efectivo ha de administrarse en dosis diarias durante períodos de 6 ó 13 días (Tanikawa y col., 1990; Patchen y col., 1990). Lo mismo ocurre con el polisacárido OK432, que necesita ser administrado durante 11 días consecutivos después de la irradiación para conseguir un aumento de la supervivencia del 67% respecto a un 0% en los controles irradiados (Kurahishita y col., 1991).

Existen inconvenientes a la hora de comparar, en base a resultados de curvas de supervivencia, la capacidad radioprotectora de los polisacáridos estudiados en esta memoria con aquella descrita para otros compuestos naturales o factores hematopoyéticos recombinantes, ya que los niveles de supervivencia para cada estudio van a venir influenciados por la dosis de radiación. Existe sin embargo un parámetro, el **factor de reducción de dosis o DRF**, que no se ve afectado por esta variable experimental, lo que le hace ser un parámetro idóneo para comparar capacidad radioprotectora entre diversos compuestos. El DRF es un indicador de cuánto se puede aumentar la dosis de radiación en el grupo tratado para conseguir la misma supervivencia que en el grupo control.

Se seleccionó el polisacárido AM218 para llevar a cabo los estudios de DRF, ya que las curvas de supervivencia de los ratones tratados con los tres polisacáridos eran muy semejantes. Así, el DRF para el AM218 administrado 1 hora antes de la irradiación a 60 mg/kg fue de 1,12, lo que demuestra la elevada capacidad radioprotectora de este compuesto, como ya indicaban las curvas de supervivencia realizadas. Este DRF era semejante al descrito para otros compuestos de naturaleza polisacáridica, como el glucano (Patchen y col., 1989) ó el dextrano sulfatado (Ross y Peeke, 1986a; 1986b) que tienen unos DRFs de 1,06 y 1,12 respectivamente. Otros radioprotectores de distinta naturaleza, como el glutatión (GSH), mercaptopropionilglicina (MPG) o indometacina, tienen DRFs de 1,10 (Nishiguchi y col., 1990; Maisin y col., 1993).

El aminotiol WR-2721, tiene uno de los DRFs más elevados descritos en la literatura para compuestos que se administran a dosis únicas (2,20) (Maisin y col., 1993). Los factores hematopoyéticos IL-1 y SCF tienen unos DRFs del orden de 1,30 y 1,35 respectivamente, si bien hay que tener en cuenta que estos compuestos muestran esta actividad cuando se administran en dosis múltiples (Wu y col., 1989; Zsebo y col., 1992).

Por tanto, los resultados de los estudios realizados en el modelo de ratones irradiados demuestran que los tres polisacáridos analizados son unos potentes radioprotectores cuando se administran antes de una irradiación potencialmente letal, siendo su capacidad radioprotectora altamente dependiente del momento en el que se administra el polisacárido respecto a la irradiación.

### **5.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RADIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251**

La capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para aumentar la supervivencia de ratones irradiados con una dosis potencialmente letal, así como para estimular la hematopoyesis de ratones normales, hacía pensar que la radioprotección conferida por estos polisacáridos en situaciones de síndrome de la médula ósea sería consecuencia del efecto beneficioso de estos compuestos sobre el sistema hematopoyético. En este sentido, los polisacáridos estudiados ejercerían su acción radioprotectora bien a través de la estimulación de la recuperación hematopoyética tras la exposición a la radiación, o bien reduciendo el daño radioinducido, permitiendo que un mayor número de precursores sobrevivieran a la irradiación.

No se descartan sin embargo otros mecanismos de acción que estén implicados en los efectos de estos polisacáridos sobre el sistema hematopoyético, si bien éstos no han sido objeto de estudio en este trabajo. Algunos de los mecanismos propuestos para otros compuestos radioprotectores, como se verá más adelante en relación con la radiosensibilidad celular, son: captación de radicales libres (Chapman y col., 1973), inducción de enzimas antioxidantes como la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) (Eastgate y col., 1993), entrada de las células en una fase del ciclo celular más radorresistente (Denenkamp, 1986; Sinclair y Morton, 1966; Hall, 1988), aumento de la resistencia a infecciones oportunistas a través de un aumento del número y/o funcionalidad de los macrófagos (Patchen y col., 1987), estabilización de la molécula de ADN (Smoluk y col., 1986), inducción de hipoxia (Purdie y col., 1983), etc.

### **5.3.1. Los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 son estimuladores de la recuperación hematopoyética en ratones con síndrome de la médula ósea**

Las dosis de radiación empleadas en los ensayos de supervivencia, provocan la muerte del animal por síndrome de la médula ósea, caracterizado por un daño a nivel de precursores hematopoyéticos, que va a conducir en último término a un descenso en el número de células maduras en sangre periférica o pancitopenia. Estos descensos conllevan la aparición de estados patológicos post-irradiación (infecciones oportunistas, hemorragias, etc) que provocan la muerte del individuo.

La gravedad del daño sobre los distintos compartimentos hematopoyéticos, va a depender de la dosis de radiación recibida. En los ensayos de supervivencia, en los que se administran dosis potencialmente letales, se produce un daño severo sobre el sistema hematopoyético, impidiendo que pueda llevarse a cabo el análisis de precursores a tiempos tempranos post-irradiación, mientras que sí es factible el análisis de células maduras circulantes procedentes de distintas líneas de diferenciación hematopoyética. Para poder llevar a cabo estudios en compartimentos más indiferenciados, los ratones han de someterse a dosis subletales de radiación, las cuales producen una deplección más moderada de los distintos precursores hematopoyéticos, permitiendo por tanto su cuantificación después de la irradiación.

Utilizando dosis de radiación potencialmente letales, se estudió la estimulación de la recuperación de células maduras en sangre periférica provocada por los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, administrados 1 hora antes de la irradiación a dosis de 60 mg/kg, pauta y dosis de administración que producía un fuerte aumento de la supervivencia (apartado 4.1.3.1.).

En relación con los niveles de leucocitos, los tres polisacáridos estimularon su recuperación. El tratamiento con AM218 y AM251 aceleró la recuperación de leucocitos ya en el día 14 post-irradiación, mientras que tras la administración de AM250, la recuperación de leucocitos no mostraba aumentos significativos respecto a los controles irradiados hasta el día 17.

La recuperación de plaquetas se vió estimulada con el polisacárido AM251 ya a tiempos tempranos después de la irradiación, mientras que el efecto del AM218 y AM250 sólo se hacía patente en el día 21 post-irradiación.

Las cinéticas de recuperación de eritrocitos se mantenían a unos niveles muy próximos a los controles no irradiados en ratones tratados con AM251. Los polisacáridos AM218 y AM250, aunque no llegaron a evitar en los primeros días post-irradiación la caída de eritrocitos en sangre periférica, sí estimularon su recuperación ya desde el día 17 después de la irradiación.

La magnitud del efecto sobre la recuperación de células maduras en sangre periférica muestra diferencias según el polisacárido analizado. Los polisacáridos AM218 y AM250 estimulaban la recuperación de células maduras en sangre periférica en menor medida que el AM251, siendo el AM218 más activo que el AM250. Es destacable el grado de estimulación de la recuperación de plaquetas alcanzada con el polisacárido AM251, ya que son pocos los compuestos descritos que muestran esta actividad. Entre ellos se encuentran el glucano-P (Patchen y McVittie, 1986b) y algunos factores hematopoyéticos administrados en dosis múltiples (Slordal y col., 1989; Tanikawa y col., 1989; Patchen y col., 1991; Zsebo y col., 1992).

Los ratones no tratados con estos polisacáridos que eran sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, mostraban los mayores índices de mortalidad entre los días 10-15 post-irradiación, días en los que se detectaron los niveles más bajos de células maduras circulantes. De esta manera, la estrecha relación existente entre supervivencia y niveles de células maduras en sangre tan ampliamente descrita en la literatura, quedaba patente en nuestros resultados. La estimulación en la recuperación de células maduras provocada por dichos polisacáridos, con el consecuente acortamiento en el período de pancitopenia, era suficiente para evitar la mortalidad de los ratones irradiados, como se pone de manifiesto en las curvas de supervivencia de animales tratados con estos polisacáridos y sometidos a irradiación potencialmente letal (apartado 4.1.3.1.).

A pesar del efecto beneficioso de los polisacáridos estudiados, al acortar el período de pancitopenia tras la irradiación, estos resultados no reflejan el efecto producido sobre compartimentos más inmaduros de precursores hematopoyéticos. Ésto es debido a que el tejido hematopoyético, si bien se encuentra dañado por efecto de la radiación, mediante mecanismos fisiológicos de compensación puede reconstituir completamente los niveles de células maduras en sangre periférica (Hellman y Botnick, 1977; Grande y col., 1990).

Así, en ratones irradiados, se planteó el estudio del efecto del tratamiento con estos polisacáridos sobre el compartimento de precursores comprometidos. Para ello, fue necesario utilizar dosis subletales de radiación para poder llevar a cabo la cuantificación de precursores a tiempos cortos después de la irradiación.

En base a datos del laboratorio (Real, 1991), para estos estudios se seleccionó la dosis de radiación de 3,0 Gy, que produce una deplección moderada del sistema hematopoyético, permitiendo cuantificar el contenido de precursores CFU-GM en médula ósea y bazo, a tiempos relativamente tempranos después de la irradiación (día 6) (apartado 4.1.3.2.).

La administración de cualquiera de los polisacáridos antes de la irradiación (1 hora ó 1 día), pautas de administración con mayor capacidad radioprotectora, provocó aumentos

significativos en el contenido de precursores CFU-GM en bazo en el día 6 post-irradiación. Cuando el tratamiento con los polisacáridos se realizó después de la irradiación, los ratones también mostraron incrementos significativos en el contenido de precursores CFU-GM en bazo.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en ratones irradiados con dosis potencialmente letales, en donde el tratamiento post-irradiación con estos polisacáridos no era capaz de mejorar la supervivencia de estos animales (apartado 4.1.3.1.b), poniendo de manifiesto que cuando el daño sobre el sistema hematopoyético es más severo, el efecto de los polisacáridos administrados post-irradiación no es suficiente como para evitar la muerte del animal. En esta dirección, se ha descrito un efecto similar tras la administración de IL-3 o sales de litio, moléculas que a pesar de ser capaces de estimular la recuperación hematopoyética en casos de irradiación subletal, no presentan efectos sobre la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales (Neta y Oppenheim, 1988; Johnke y Abernathy, 1991).

En la médula ósea de ratones irradiados subletalmente, el efecto estimulador de los polisacáridos era muy discreto. Únicamente el tratamiento con el polisacárido AM218 un día después de la irradiación aumentó el nivel de precursores CFU-GM en este órgano. Sin embargo, según sugieren diversos autores, tras la exposición a dosis subletales de radiación se ponen a funcionar todos los mecanismos disponibles para recuperar la hematopoyesis de la médula ósea, encontrándose el sistema funcionando tan activamente que hace difícil el que se pueda detectar un estímulo adicional aportado por estos polisacáridos sobre el contenido de precursores en la médula ósea (Patchen y col., 1990; Johnke y Abernathy, 1991).

Los estudios llevados a cabo en ratones irradiados subletalmente son de gran interés, al demostrar que en situaciones de daño hematopoyético leve, los polisacáridos estudiados son también activos cuando se administran después de la irradiación, lo que amplía su rango de aplicaciones tanto a situaciones de exposición accidental a radiación, como a casos de radioterapia controlada. En este último caso, hay que tener en cuenta que la mayoría de los tratamientos antitumorales de radioterapia consisten en exposiciones cíclicas a dosis subletales de radiación.

Los resultados obtenidos tanto a nivel de células maduras circulantes en ratones irradiados con dosis potencialmente letales, como a nivel de precursores comprometidos en el caso de ratones subletalmente irradiados, ponen de manifiesto la capacidad de los tres polisacáridos ensayados para estimular la recuperación hematopoyética en situaciones de mielosupresión, tanto moderada como severa, lo que explicaría la alta radioprotección conferida por estos polisacáridos a ratones que sufren el síndrome hematopoyético.

Este mecanismo de radioprotección ha sido descrito también para otros compuestos de diversa naturaleza como el complejo polisacárido-proteína AM5, el glucano-P, y algunos factores hematopoyéticos recombinantes, que impiden la muerte del animal tras la irradiación al acelerar la recuperación hematopoyética (Patchen y McVittie, 1986b; Patchen y col., 1990; Real y col., 1992; Zsebo y col., 1992).

### **5.3.2. El polisacárido AM218 actúa disminuyendo la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos**

El hecho de que los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 mostraran un fuerte efecto radioprotector cuando eran administrados antes de la irradiación, hizo pensar que podrían actuar disminuyendo la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos y en consecuencia, permitir que sobrevivieran un mayor número de éstos a la irradiación favoreciéndose por tanto la recuperación hematopoyética post-irradiación.

En una primera aproximación se estudió el efecto del polisacárido AM218 administrado *in vitro* sobre la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos (apartado 4.2.1.2.), incubando una suspensión celular de médula ósea durante distintos tiempos con 250 µg/ml del polisacárido AM218, dosis que había mostrado capacidad para estimular la hematopoyesis medular en el LTBM (apartado 4.1.2), irradiándose posteriormente la suspensión celular con una dosis subletal de 3,0 Gy.

La incubación durante 1, 24 ó 48 horas con el polisacárido AM218 en ausencia de suero aumentó la supervivencia de los precursores CFU-GM presentes en las suspensiones de médula ósea después de una irradiación subletal, si bien la supervivencia alcanzada cuando la incubación fue de 1 hora es menor que la obtenida con incubaciones de 24 y 48 horas (apartado 4.2.1.2.).

En estos experimentos, como consecuencia de la ausencia de suero en medio de cultivo, se observó un descenso del número de precursores CFU-GM a lo largo del tiempo de incubación. Por tanto, se llevaron a cabo estudios en donde la incubación de las suspensiones se realizó en presencia de suero. La supervivencia post-irradiación de precursores CFU-GM tras 1 ó 48 horas de incubación con el polisacárido no se vio afectada por la presencia de suero. Sin embargo, en aquellas suspensiones incubadas durante 24 horas con el polisacárido en presencia de suero, se observó un fuerte descenso en la supervivencia de CFU-GM tras la irradiación, respecto a lo observado en las mismas suspensiones en ausencia de suero.

Posteriormente, se estudió si el efecto descrito *in vitro*, se reproducía cuando el tratamiento con AM218 se llevaba a cabo *in vivo*, determinándose en este caso la radiosensibilidad tanto

de precursores comprometidos como pluripotentes (apartado 4.2.1.2.). Para estos estudios, a distintos tiempos después de la administración *i.v.* de 60 mg/kg de AM218 se extrajo la médula ósea. Los tiempos de análisis post-tratamiento eran coincidentes con los tiempos de incubación utilizados previamente (1, 24 y 48 horas). Una vez preparada la suspensión celular de médula, ésta se irradió *in vitro* con una dosis de 3,0 Gy, como en los estudios anteriores.

El tratamiento con el polisacárido AM218 *in vivo*, independientemente de que se llevara a cabo 1, 24 ó 48 horas antes del análisis, aumentaba la supervivencia de precursores CFU-GM de médula ósea después de la irradiación.

En el compartimento pluripotente, la supervivencia de precursores CFU-S<sub>12d</sub> aumentó en ratones tratados con AM218, 48 horas antes del análisis, mientras que los tratamientos 24 horas ó 1 hora antes de la extracción de la médula ósea no modificaron el porcentaje de supervivencia de precursores CFU-S<sub>12d</sub>.

Estos datos confirman que el tratamiento *in vivo* con el polisacárido AM218 disminuye la radiosensibilidad de precursores CFU-GM y en menor medida la de precursores CFU-S<sub>12d</sub>. La magnitud del efecto sobre la supervivencia de precursores hematopoyéticos con el tratamiento *in vivo* era menor que la observada tras la incubación *in vitro*.

La radiosensibilidad de los distintos precursores hematopoyéticos depende de las condiciones experimentales que se utilicen para su determinación, como el tipo de irradiación, irradiación *in vivo* o *in vitro*, presencia o ausencia de suero, etc (Hendry y Lord, 1983; Peacock y col., 1986; Imai y Nakao, 1987; Baird y col., 1990; 1991). Así, la radiosensibilidad de precursores CFU-GM es muy variable y aunque el precursor CFU-S<sub>12d</sub> ha sido descrito como más radiosensible (Meijne y col., 1991), no es extraño que los porcentajes de supervivencia obtenidos en nuestras condiciones experimentales con la dosis de 3,0 Gy sean iguales para ambos precursores (8% de supervivencia).

Los factores hematopoyéticos, G-CSF, GM-CSF e IL-1 poseen capacidad para disminuir la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos (Gallicchio y col., 1989; Uckun y col., 1989; Zucali y col., 1994). Los autores proponen unos mecanismos de radioprotección, ya comentados, en los que la disminución de la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos se debe a una reducción en el número absoluto de precursores en los estadios más radiosensibles del ciclo celular o a la inducción de enzimas antioxidantes con capacidad de captar radicales libres (Broxmeyer y col., 1986; Neta y col., 1987; Wong y Goeddel, 1988; Eastgate y col., 1993; Hirose y col., 1993).

Quedaba así demostrado que el polisacárido AM218 ejerce su acción radioprotectora tanto acelerando la recuperación hematopoyética como disminuyendo la radiosensibilidad de los

precusores hematopoyéticos. El efecto sobre la recuperación hematopoyética post-irradiación, no siempre está relacionado con un descenso en la radiosensibilidad de precusores hematopoyéticos, ya que como se ha descrito en ratones subletalmente irradiados, existe una estimulación en el compartimento de CFU-GM cuando los polisacáridos son administrados después de la irradiación.

#### **5.4. INDUCCIÓN DE FACTORES HEMATOPOYÉTICOS TRAS EL TRATAMIENTO CON LOS POLISACÁRIDOS AM218, AM250 Y AM251. PAPEL MEDIADOR EN LA ACTIVIDAD DE ESTOS POLISACÁRIDOS SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO**

Existen numerosas evidencias en la bibliografía que ponen de manifiesto el importante papel desempeñado por los factores hematopoyéticos en la radioprotección de animales sometidos a dosis potencialmente letales de radiación. Así, Neta y col., han demostrado que factores como la IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  o SCF son importantes en la radioprotección endógena del sistema hematopoyético del ratón, ya que cuando cualquiera de estos factores es bloqueado con anticuerpos específicos, los ratones muestran una elevada mortalidad frente a la irradiación (Neta y col., 1991; 1992; 1993). Además, se ha descrito que la administración exógena de factores hematopoyéticos recombinantes como IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  o SCF aumenta de manera significativa la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales de radiación, a través de sus efectos sobre la recuperación y/o protección del sistema hematopoyético (Neta y col., 1986; 1988a; Zsebo y col., 1992).

Por tanto, cabía postular que en los efectos asociados a los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, los factores hematopoyéticos desempeñaran un papel mediador induciéndose su producción tras la administración de estos polisacáridos. Para llevar a cabo estos estudios, se planteó en una primera aproximación el uso de LTBMCS, que como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria, constituye un sistema idóneo para estos estudios, al reproducir *in vitro* con gran fidelidad la hematopoyesis medular.

Previamente se ha demostrado que el tratamiento *in vitro* con dichos polisacáridos es capaz de estimular la hematopoyesis en LTBMCS (apartado 4.1.2). Así, con las mismas condiciones experimentales utilizadas en esos ensayos, se analizó si los polisacáridos inducían la liberación de factores hematopoyéticos al sobrenadante del LTBMCS, mediante el ensayo de actividad estimuladora de colonias CFU-GM (GM-CSA) (apartado 4.2.2.1.a.). En este ensayo, al ser el sobrenadante de los LTBMCS la única fuente de factores de crecimiento, sólo tendrá lugar el desarrollo de colonias *in vitro* si se han liberado factores a dicho sobrenadante.

A ninguno de los tiempos de análisis (6, 16 horas ó 7 días) se detectó GM-CSA en los sobrenadantes de cultivos control sin tratar. A este respecto, existe cierta controversia entre



distintos autores, ya que mientras que algunos no han detectado GM-CSA en cultivos control (Dexter y col., 1977; Veiby y col., 1992), otros sí han descrito presencia de GM-CSA en estos cultivos (Lipschitz y col., 1987; Udupa y Lipschitz, 1988), si bien los niveles detectados son siempre bajos y muy dependientes de las condiciones de cultivo utilizadas por cada laboratorio (cepa de ratón, lote de suero, concentración de hidrocortisona, frecuencia del cambio de medio, etc) (Shadduck y col., 1983).

En los sobrenadantes de cultivos tratados con AM218, se detectó actividad GM-CSA a las 16 horas del tratamiento, mientras que con los polisacáridos AM250 ó AM251 no se detectó actividad GM-CSA a ninguno de los tiempos de análisis. A pesar de estos resultados, no se podía descartar la presencia de CSAs en los sobrenadantes de los cultivos, ya que está descrito que diversas células hematopoyéticas liberan inhibidores de bajo peso molecular, los cuales enmascaran la actividad estimuladora de los factores presentes en los sobrenadantes, impidiendo por tanto que éstos promuevan la formación de colonias *in vitro* (Metcalf, 1971; Shadduck, 1976).

Así pues, se llevó a cabo el análisis de producción de factores hematopoyéticos en LTBMCS mediante la técnica de inmunoensayo enzimático, ELISA, ensayo en el que no interfieren posibles moléculas inhibitoras presentes en el medio. Los sobrenadantes de LTBMCS utilizados para estos ensayos fueron recogidos 16 horas después del tratamiento con los polisacáridos, tiempo en el que se había detectado actividad GM-CSA en los cultivos tratados con AM218, así como 7 días después del tratamiento.

Los estudios de ELISA mostraron que no existían niveles detectables de GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-3 ni en cultivos control ni en cultivos tratados con los diferentes polisacáridos. El hecho de que en el sobrenadante de cultivos tratados con AM218 no se detectara GM-CSF, a pesar de haber observado actividad estimuladora de colonias CFU-GM, hacía pensar que dicha actividad se debería a otros factores como el M-CSF o G-CSF que por sí solos también poseen capacidad para inducir la formación de colonias CFU-GM *in vitro*.

Con los resultados obtenidos en ensayos de ELISA, no se pudo demostrar la inducción de producción de factores hematopoyéticos tras el tratamiento del LTBMCS con los polisacáridos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que aún produciéndose factores, éstos pueden no ser liberados bien porque permanezcan como formas activas ligadas a membrana como es el caso de la IL-1 $\alpha$ , SCF, M-CSF o GM-CSF (Gough y col., 1985; Kurt-Jones y col., 1985; Flanagan y Leder, 1990; Stein y col., 1990; Gordon, 1991; Toksoz y col., 1992), o bien porque sean secuestrados por la matriz extracelular actuando de forma local (Gordon y col., 1987; Roberts y col., 1988). De hecho, distintos autores han demostrado en LTBMCS que los factores hematopoyéticos son liberados al sobrenadante en concentraciones muy bajas, lo que hace que sean prácticamente indetectables tanto por bioensayos como por inmunoensayos (Tushinski y col., 1982; Tavassoli y col., 1990).

Así, y con objeto de poder sacar conclusiones sobre el papel de los factores hematopoyéticos en la mediación de los efectos estimuladores de estos polisacáridos, nos planteamos el estudio de la expresión de factores hematopoyéticos en la capa adherente del LTBM, ya que son las células estromales las encargadas mayoritariamente de la producción de dichos factores (Eliason y col., 1988; Kittler y col., 1992). Los estudios de expresión se realizaron mediante *Northern blot* con los ARNs obtenidos de la población total de la capa adherente de cultivos tanto control como tratados con los diferentes polisacáridos (apartado 4.2.2.1.b.).

En la capa adherente de cultivos control se detectaron los transcritos del SCF, M-CSF, IL-1 $\alpha$ , G-CSF y TNF $\alpha$ , mientras que no se detectó expresión de GM-CSF, IL-6 ó IL-3 (tabla XI), incluso cuando la extracción del ARN fue a tiempos tempranos después del cambio de medio, cuando se había descrito por otros autores la mayor producción de factores hematopoyéticos en el cultivo (Lipschitz y col., 1987; Udupa y Lipschitz, 1988). El SCF fue el único factor que mantuvo niveles de expresión constantes hasta 7 días después del cambio de medio.

		SCF	M-CSF	IL-1 $\alpha$	G-CSF	TNF $\alpha$	IL-6	GM-CSF	IL-3
Control	+6h	++	++	+	±	+++	-	-	-
	+16h	+++	++	++	+	++	-	-	-
	+7d	+++	+	±	±	+	-	-	-
AM218	+6h	++	+++	++++	++	++++	++	+	-
	+16h	+++	+++	+++	+	++	-	-	-
	+7d	+++	+	±	±	±	-	-	-
AM250	+6h	++	+++	+++	+	++++	++	+	-
	+16h	+++	++	+	±	+	-	-	-
	+7d	+++	+	±	-	+	-	-	-
AM251	+6h	++	+++	+++	+	++++	++	+	-
	+16h	+++	+	+	±	±	-	-	-
	+7d	+++	+	±	±	±	-	-	-

**Tabla XI:** Resumen de los patrones de expresión de diversos factores hematopoyéticos en la capa adherente de LTBM control y tratados con los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, a distintos tiempos después del cambio de medio.

Otros autores han descrito en cultivos control, además de los factores detectados en nuestros cultivos, expresión de GM-CSF e IL-6 (Kittler y col., 1992; McGrath y col., 1992). Estas diferencias podrían deberse a las distintas cepas de ratón utilizadas para establecer el LTBM

o las condiciones experimentales del cultivo (concentración de hidrocortisona, cambio semanal de la mitad o de todo el medio, etc). Al igual que lo descrito en nuestros resultados, otros autores tampoco han sido capaces de detectar expresión de IL-3 en la capa adherente del LTBMCM mediante análisis por *Northern blot* (Spooncer y col., 1986; Eliason y col., 1988). Sin embargo, Kittler y col., han detectado expresión subóptima de este factor en cultivos no estimulados, utilizando la *reacción en cadena de la polimerasa* para la amplificación del ADNc correspondiente, sintetizado a partir de su ARNm celular (RT-PCR) (Kittler y col., 1992).

En relación a los cultivos tratados con los polisacáridos, los patrones de expresión de factores hematopoyéticos inducidos en LTBMCMs fueron muy similares entre los distintos polisacáridos (tabla XI). En los cultivos tratados con estos polisacáridos, se detectaron niveles de SCF similares a los descritos en los cultivos control, que al igual que ocurría en éstos, se mantenían constantes hasta 7 días después del cambio de medio. En relación al M-CSF, IL-1 $\alpha$ , G-CSF y TNF $\alpha$ , factores que sí se detectan en los cultivos control, el tratamiento con los polisacáridos aumentó y/o adelantó su expresión. Los factores GM-CSF e IL-6, que no se detectaban en cultivos control, se expresaban 6 horas después del tratamiento con cualquiera de los polisacáridos (tabla XI). Como en el caso de los cultivos control, en los cultivos tratados con los polisacáridos no se pudo detectar expresión de IL-3 a ninguno de los tiempos de análisis.

Los resultados de expresión demostraban que los tres polisacáridos estimulaban diversos factores hematopoyéticos en la capa adherente de LTBMCMs, si bien este aumento de expresión no se correlacionaba con un aumento en la liberación de factores al sobrenadante de los cultivos. Esta falta de correlación podría deberse a que los factores no se liberen en forma soluble o bien a que tenga lugar un control post-transcripcional en la producción de factores. Este tipo de regulación ha sido descrita al menos para el M-CSF, TNF $\alpha$  y GM-CSF (Beutler y col., 1986; Rettenmier y col., 1987; Thorens y col., 1987), si bien la mayoría de los factores controlan su producción a nivel transcripcional (Seelentag y col., 1987; Taniguchi, 1988; Nicola, 1989).

Los patrones de expresión de factores obtenidos en la capa adherente de los cultivos tratados con los polisacáridos estudiados, no nos permitía determinar la secuencia de expresión de dichos factores, ya que todos ellos se detectaban a las 6 horas después del cambio de medio. Se contemplan por tanto dos posibilidades, bien que estos polisacáridos induzcan directamente la expresión de todos los factores detectados, o bien que induzcan únicamente la liberación de uno o dos factores, siendo éstos los encargados de estimular la producción del resto. A este respecto, se ha descrito que la IL-1 $\alpha$  y el TNF $\alpha$  poseen capacidad para inducir la expresión de otros factores hematopoyéticos como IL-6, G-CSF, GM-CSF o M-CSF (Broudy y col., 1986; Munker y col., 1986; Zucali y col., 1986; Zsebo y col., 1988).

Estos resultados ponen de manifiesto que los tres polisacáridos tienen la capacidad de inducir la expresión de una serie de factores hematopoyéticos en el LT BMC. Puesto que esos factores tienen la capacidad de estimular la proliferación de precursores hematopoyéticos, pudiendo además sinergizar entre sí (Metcalf y Nicola, 1991; Metcalf, 1993), estaría a favor de la hipótesis de que son los mediadores de la acción estimuladora de dichos polisacáridos sobre la hematopoyesis del LT BMC.

Otros compuestos de diversa naturaleza han mostrado patrones de expresión de factores hematopoyéticos similares a los descritos con estos polisacáridos. Entre ellos se encuentran el complejo polisacárido-proteína AM5 (Güenechea y col., 1995) o las sales de litio (McGrath y col., 1992).

Kittler y col., observaron aumento en la expresión de SCF, G-CSF, GM-CSF e IL-6 en la capa adherente de LT BMCs cuando éstos eran tratados de forma exógena con IL-1 $\alpha$  o lectina (PWM). Además, en el sobrenadante de esos cultivos se detectó presencia de IL-3, GM-CSF e IL-6 mediante ensayos con líneas dependientes de factores (Kittler y col., 1992).

Para todos estos compuestos (sales de litio, IL-1, PWM y AM5), se ha postulado que su acción estimuladora sobre la hematopoyesis está mediada por factores hematopoyéticos producidos por células del estroma (McGrath y col., 1992; Kittler y col., 1992; Güenechea y col., 1995).

Una vez demostrada la capacidad de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 para inducir la expresión de factores hematopoyéticos en el LT BMC, el siguiente paso para corroborar *in vivo* los resultados descritos *in vitro*, era demostrar que estos mismos mediadores participaban en los diferentes efectos asociados al tratamiento *in vivo* con los polisacáridos. Así, 1 hora después de la administración de los polisacáridos (60 ó 100 mg/kg) se analizaron los niveles de expresión de diversos factores hematopoyéticos en la médula ósea y bazo, así como su presencia en suero en forma de proteínas solubles (apartado 4.2.2.2.). Hay que tener en cuenta que los niveles de expresión de los factores hematopoyéticos en médula ósea y bazo de ratones normales son en general muy bajos y que la tasa de producción de factores hematopoyéticos es muy baja, siendo del mismo orden que la tasa de consumo, lo que dificulta la detección de factores hematopoyéticos *in vivo* (Tushinski y col., 1982; Nicola, 1989).

En la médula ósea y bazo de ratones control no se detectó expresión de ninguno de los factores hematopoyéticos analizados mediante *Northern blot*, excepto una modesta expresión del M-CSF en bazo (tabla XII). La ausencia de expresión de factores hematopoyéticos en esos órganos está de acuerdo con resultados de otros autores. Tanto en la médula ósea, como en el bazo de ratones no tratados, Broudy y col., mediante *Northern blot* no detectaban expresión

del GM-CSF, G-CSF, TNF, IL-3, IL-4 e IL-5, únicamente mostraron presencia de transcritos del M-CSF en bazo y de la IL-1 $\beta$  en médula ósea (Broudy y col., 1990).

En relación a los ratones tratados, en el bazo se detectó expresión de IL-1 $\alpha$  tras el tratamiento con cualquiera de los polisacáridos, si bien dicha expresión era más patente con los polisacáridos AM218 y AM251 (tabla XII). Los niveles de expresión del resto de factores hematopoyéticos en bazo de ratones tratados eran muy bajos y prácticamente indetectables.

		SCF	M-CSF	IL-1 $\alpha$	TNF $\alpha$	G-CSF	IL-6	GM-CSF	IL-3
Control	fémur	-	-	-	-	-	-	-	-
AM218	60	+	++	+++	++	-	-	-	-
	100	±	+	++	+	-	-	-	-
AM250	60	±	+	±	±	-	-	-	-
	100	±	+	±	±	-	-	-	-
AM251	60	+	+	+	±	-	-	-	-
	100	++	+++	++	±	-	-	-	-
Control	bazo	-	±	-	-	-	-	-	-
AM218	60	-	±	+	-	-	-	-	-
	100	-	±	+	-	-	-	-	-
AM250	60	-	±	±	-	-	-	-	-
	100	-	±	±	-	-	-	-	-
AM251	60	-	±	+	-	-	-	-	-
	100	-	±	±	-	-	-	-	-

**Tabla XII:** Resumen de la expresión de factores hematopoyéticos en la médula ósea y bazo de ratones control y tratados con 2 dosis distintas de los polisacáridos AM218, AM250 y AM251 1 hora antes de la extracción del ARN.

En la médula ósea se detectó expresión de SCF, M-CSF, IL-1 $\alpha$  y TNF $\alpha$  1 hora después del tratamiento con los polisacáridos, siendo el nivel de expresión diferente según el polisacárido administrado. El polisacárido AM218 aumentó fundamentalmente la expresión de la IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  y M-CSF, mientras que el AM251 inducía la expresión del SCF, IL-1 $\alpha$  y M-CSF. Con el polisacárido AM250, la expresión de los factores hematopoyéticos era muy baja (tabla XII). El patrón y nivel de expresión de los factores hematopoyéticos era independiente de la dosis ensayada para los polisacáridos AM218 y AM250, mientras que el polisacárido AM251

mostraba una relación entre la dosis administrada y el nivel de expresión detectado para los distintos factores.

Se llevaron a cabo análisis mediante ELISA para determinar si los factores hematopoyéticos expresados en la médula ósea o bazo, u otros producidos en otros órganos eran secretados en forma soluble al suero de ratones tratados. Ninguno de los factores analizados, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-3 y GM-CSF, se detectó en el suero de ratones control. Una hora después del tratamiento con los polisacáridos se observó un aumento modesto en la producción del GM-CSF en suero. El tratamiento con los polisacáridos AM218 ó AM250 incrementó los niveles de IL-6 en suero, lo que no ocurre en el caso de ratones tratados con AM251. Con ningún polisacárido se detectó producción de IL-1 $\alpha$  o IL-3 en suero, 1 hora después del tratamiento.

Mediante *Northern blot* no se detectó en ningún caso expresión de GM-CSF o IL-6 en la médula ósea o el bazo de ratones tratados con los polisacáridos. Sin embargo, estos factores sí se detectaron en forma soluble en el suero de estos ratones, lo que sugería que el GM-CSF e IL-6 se estaban produciendo en otros órganos (hígado, pulmón, piel, etc) (Mizuno y col., 1993) o que el ARNm producido en médula ósea o bazo es muy inestable, siendo indetectable en el momento en el que se realizó el análisis.

Aunque se había detectado ARNm para la IL-1 $\alpha$  en la médula ósea y bazo de ratones tratados con los polisacáridos, no se detectó IL-1 $\alpha$  soluble en el suero de los ratones mediante ELISA. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la IL-1 $\alpha$  es un factor que se libera lentamente, permaneciendo más tiempo unida a membrana (Kurt-Jones y col., 1985). Por otro lado, su liberación al suero se podía ver retrasada, siendo indetectable 1 hora después del tratamiento con los polisacáridos.

Estos estudios demostraban que la administración de los polisacáridos *in vivo* induce la expresión de IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , SCF y M-CSF en médula ósea o bazo, así como la liberación de GM-CSF e IL-6 al suero, siendo el patrón de expresión y/o producción dependiente del polisacárido administrado.

Hay que resaltar que entre los factores hematopoyéticos detectados *in vivo* tras el tratamiento con estos polisacáridos se encuentran la IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF $\alpha$  y SCF, factores que se han descrito como esenciales en la radioprotección endógena de ratones. Además, está ampliamente documentado que la IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  y SCF son unos potentes radioprotectores con capacidad para acelerar la recuperación hematopoyética tras la irradiación, así como para disminuir la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos (Schwartz y col., 1988; Slordal y col., 1989; Zsebo y col., 1992; Patchen y col., 1994; Zucali y col., 1994).

Quedaba así demostrado que los tres polisacáridos son capaces de inducir la expresión y/o producción de factores hematopoyéticos tanto *in vitro* (en el LTBM), como *in vivo* (en ratones normales), lo que sugiere que en los efectos estimuladores asociados a estos polisacáridos, los factores hematopoyéticos desempeñan un papel mediador.

## **CONCLUSIONES**



1. Los polisacáridos AM218, AM250 y AM251, estimulan la hematopoyesis esplénica de ratones normales cuando son administrados *i.v.* en dosis únicas de 60-100 mg/kg.
2. Los tres polisacáridos estimulan la hematopoyesis medular *in vitro* en cultivos de larga duración, si bien este efecto no es detectado *in vivo* debido probablemente a fenómenos de movilización de precursores hematopoyéticos.
3. Los polisacáridos estudiados son unos potentes radioprotectores cuando se administran antes de una irradiación potencialmente letal, siendo esta capacidad radioprotectora altamente dependiente de la pauta de administración de los polisacáridos.
4. El aumento de supervivencia observado en ratones irradiados con dosis potencialmente letales y tratados con estos polisacáridos, se debe a su capacidad para acortar el período de pancitopenia post-irradiación.
5. En animales que han sufrido un daño moderado en su sistema hematopoyético como consecuencia de la exposición a irradiación subletal, el tratamiento con cualquiera de los polisacáridos provoca un aumento en el contenido de precursores hematopoyéticos CFU-GM en bazo a tiempos cortos post-irradiación, independientemente de que los polisacáridos se administren antes o después de la irradiación.
6. El tratamiento con el polisacárido AM218 disminuye la radiosensibilidad de precursores hematopoyéticos tanto comprometidos (CFU-GM) como pluripotentes (CFU-S), permitiendo que sobrevivan en mayor número a la irradiación y por tanto favoreciendo la recuperación hematopoyética posterior.
7. El tratamiento *in vitro* con los polisacáridos estudiados induce la expresión de los factores hematopoyéticos IL-1 $\alpha$ , IL-6, G-CSF, GM-CSF, M-CSF y TNF $\alpha$  en las células de la capa adherente de cultivos de larga duración.
8. El tratamiento *in vivo* con los polisacáridos induce la expresión de IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , SCF y M-CSF en médula ósea y de IL-1 $\alpha$  en bazo, e induce asimismo la liberación de cantidades detectables de GM-CSF e IL-6 en suero.
9. No existe correlación entre niveles de expresión y de producción de factores hematopoyéticos inducidos por los diferentes polisacáridos, ni *in vivo* ni *in vitro*.

10. En resumen se puede concluir que los tres polisacáridos objeto de estudio poseen una elevada capacidad radioprotectora en el rango de dosis de radiación que provoca la muerte de los animales por síndrome hematopoyético, al acelerar la recuperación hematopoyética post-irradiación. La inducción de factores hematopoyéticos se postula como el mecanismo por el cual los polisacáridos ejercen su acción sobre el sistema hematopoyético.

Por todo ello, los polisacáridos descritos en esta memoria representan moléculas con una potencial aplicación como terapia de apoyo en situaciones de mielosupresión, si bien es necesario llevar a cabo los correspondientes ensayos preclínicos, que confirmen que los efectos de los polisacáridos observados en un sistema experimental de ratón se reproducen en humanos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- AINSWORTH, E.J. y HATCH, M.H. (1958). "Decreased X-ray mortality in endotoxin treated mice". Radiation Research 9: 96-102.
- AINSWORTH, E.J. y HATCH, M.H. (1960). "The effect of *Proteus morganii* endotoxin on radiation mortality in mice". Radiation Research 13: 632-638.
- ANAGNOSTOU, A., DAINIAK, N. y NAJMAN, A. (1991). "*Negative regulators of hematopoiesis. Studies on their nature, action and potential role in cancer therapy*". Annals of the New York Academy of Science 628.
- ANDERSON, D.M., LYMAN, S.D., BAIRD, A., WIGNALL, J.M., EISENMAN, J., RAUCH, C., MARCH, C.J., BOSWELL, S., GIMPEL, S.D., COSMAN, D. y WILLIAMS, D.E. (1990). "Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms". Cell 63: 235-243.
- ANTMAN, K., GRIFFIN, J., ELIAS, A., SOCINSKI, M.A., RYAN, L., CANNISTRA, S.A., OETTE, D., WHITLEY, M., FREI, E. y SCHINIPPER, L.E. (1988). "Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy induced myelosuppression". New England Journal of Medicine 319: 593-598.
- ARKIN, S., NAPRSTEK, B., GUARINI, L., FERRONE, S. y LIPTON, J.M. (1991). "Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD-45) on hematopoietic progenitors". Blood 77: 948-953.
- AXELRAD, A.A., MC LEOD, D.L., SHREEVE, M.M. y HEATH, D.S. (1973). "Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro". En: *Hemopoiesis in culture*. Robinson, W.A. (Eds.). DHEW Publications (NIH), Bethesda. pp. 74-205.
- AXELRAD, A.A. (1990). "Some hemopoietic negative regulators". Experimental Hematology 18: 143-150.
- BAIRD, M.C., HENDRY, J.H. y TESTA, N.G. (1990). "Radiosensitivity increases with differentiation status of murine hemopoietic progenitor cells selected using enriched marrow subpopulations and recombinant growth factors". Radiation Research 123: 292-298.
- BAIRD, M.C., HENDRY, J.H., DEXTER, M.T. y TESTA, N.G. (1991). "The radiosensitivity of populations of murine hemopoietic colony-forming cells that respond to combinations of growth factors". Experimental Hematology 19: 282-287.
- BALMAIN, A., KRUMLAUF, R., VASS, J.K. y BIRNIE, G.D. (1982). "Cloning and characterization of the abundant cytoplasmic 7S RNA from mouse cells". Nucleic Acids Research 10: 4259-4277.
- BECKER, A.J., Mc CULLOCH, E.A. y TILL J.E. (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells". Nature 197: 452-454.
- BENTLEY, S.A. (1981). "A close range cell:cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture". Experimental Hematology 9: 303-312.
- BEUTLER, B.A., MILSARK, I.W. y CERAMI, A. (1985). "Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate *in vivo*". Journal of Immunology 135: 3972-3977.

- BEUTLER, B., KROCHIN, N., MILSARK, I.W., LEUDKE, C. y CERAMI, A. (1986). "Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance". Science 232: 977-980.
- BEUTLER, B. y CERAMI, A. (1986). "Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin". Nature 320: 584-588.
- BEUTLER, B. y CERAMI, A. (1989). "The biology of cachectin/TNF- a primary mediator of the host response". Annual Reviews of Immunology 7: 625-632.
- BLUME, K.G. (1986). "A review of bone marrow transplantation". International Journal of Cell Cloning 4 (Suppl 1): 3-10.
- BODINE, M., CROSIER, P. y CLARK, S. (1991). "Effects of hematopoietic growth factors on the survival of primitive stem cells in liquid culture". Blood 78: 914-920.
- BOL, S. y WILLIAMS, N. (1980). "The maturation state of three types of granulocyte-macrophage progenitor cells from mouse bone marrow". Journal of Cellular Physiology 102: 233-244.
- BRADLEY, T.R. y METCALF, D. (1966). "The growth of mouse bone marrow cells in vitro". Australian Journal of Experimental Biology and Medicine Science 44: 2287-2300.
- BRADLEY, T.R. y HODGSON, G.S. (1979). "Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow". Blood 54: 1446-1450.
- BRECKER, G. y CRONKITE, E.P. (1950). "Morphology and enumeration of human blood platelets". Journal of Applied Physiology 3: 365-372.
- BRINES, R. (1993). "Immunopharmacology". Immunology Today 14.
- BRONCHUD, M.H., POTTER, M.R., MORGENSTERN, G., BLASCO, M.J., SCARFFE, J.H., THATCHER, N., CROWTHER, D., SOUZA, L.M., ALTON, N.K., TESTA, N.G. y DEXTER, T.M. (1987). "In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients". British Journal of Cancer 58: 64-70.
- BROUDY, V.C., KAUSHANSKY, K., SEGAL, M., HARLAN, J.M. y ADAMSON, J.W. (1986). "Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83: 7467-7471.
- BROUDY, V.C., KAUSHANSKY, K., SHOEMAKER, S.G., AGGARWAL, B.B. y ADAMSON J.W. (1990). "Muramyl dipeptide induces production of hemopoietic growth factors in vivo by a mechanism independent of tumor necrosis factor". Journal of Immunology 144: 3789-3794.
- BROXMEYER, H.E., WILLIAMS, D.E., COOPER, S., SHADDUCK, R.K., GILLIS, S., WAHEED, A., URDAL, D. y BICKNE, D.C. (1986). "The comparative effects *in vivo* of recombinant murine interleukin-3 (IL-3), recombinant murine granulocyte-macrophage (GM) colony-stimulating factor (CSF) and natural murine (CSF-1) on myelopoiesis in mice". Journal of Clinical Investigation 79: 721-730.
- BROXMEYER, H.E. y WILLIAMS, D.E. (1988). "The production of myeloid blood cells and their regulation during health and disease". CRC Crit. Rev. Oncol/Hematol 8: 173-179.

- BROXMEYER, H.E., SHERRY, B., LU, L., COOPER, S., OH, K-O., TEKAMP-OLSON, A., KWON, B.S. y CERAMI, A. (1990). "Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation *in vitro* by bone marrow myeloid progenitor cells". Blood 76: 1110-1116.
- BROXMEYER, H.E. (1992). "Combination cytokine therapy or a compound that may indirectly mimic such effects by stimulating production of multiple cytokines?". Experimental Hematology 20: 149-151.
- BUTTURINI, A, GALE, R.P., LOPES, D.M., CUNHA, C.B., HO, W.G., SANPAI, J.M., DE SOUZA, P.C., CORDIERO, J.M., NETO, C., DE SOUZA, C.E.P., TABAK, D.G. y BURLA, A. (1988). "Use of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor in the Brazil radiation accident". The Lancet 2: 471-475.
- CAMPBELL, A.D., LONG, M.W. y WICHA, M.S. (1987). "Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage". Nature 329: 744-746.
- CANNISTRA, S.A., VELLENGA, E., GROSHEK, P., RAMBALDI, A. y GRIFFIN, J.D. (1988). "Human GM-CSF and IL-3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumour necrosis factor-dependent mechanism". Blood 71: 672-676.
- CARACCILO, D., CLARK, S.C., y RONERA, G. (1989). "Human IL-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF". Blood 73: 666-670.
- CHAMPLIN, R.E., NIMER, S.D., IRELAND, P., OETTE, D.H. y GOLDE, D.W. (1989). "Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Blood 73: 694-699.
- CHAPMAN, J.D., PALCIC, B. y SKARSGARD, L.D. (1973). "Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing *in vitro*". Radiation Research 56: 291-306.
- CHATELAIN, C., DE BAST, M. y SYMANN, M. (1988). "Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M)". Blood 72: 1187-1191.
- CHERTKOV, J.L., DRIZE, N.J., GUREVICH, O.A. y UDALOV, G.A. (1986). "Cells responsible for restoration of haemopoiesis in long-term bone marrow culture". Leukemia Research 10: 659-664.
- CHIU, C-P., MOULDS, C., COFFMAN, R.L., RENNICK, D. y LEE, F. (1988). "Multiple biological activities are expressed by a mouse interleukin 6 cDNA clone isolated from bone marrow stromal cells". Proceedings of the National Academy of Science USA 85: 7099-7103.
- CHOMCZYNSKI, P. y SACCHI, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Analytical Biochemistry 162: 156-159.
- CLARK, S.C. (1988). "Biological activities of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". International Journal of Cell Cloning 6: 365-377.

- CONSTINE, L.S., HARWELL, S., KENG, P., LEE, F., RUBIN, P. y SIEMANN, D. (1991). "Interleukin 1 alpha stimulates hemopoiesis but not tumor cell proliferation and protects mice from lethal total body irradiation". International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 20: 447-456.
- COULOMBEL, L., EVANS, A.C. y EVANS, C.J. (1981). "Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer". Blood 62: 291-297.
- CROIZAT, H., FRINDEL, E. y TUBIANA, M. (1970). "Proliferative activity of the stem cells in the bone marrow of mice after single and multiple irradiation (total or partial body exposure)". International Journal of Radiation Biology 18: 347-358.
- CURTIS, B.M., WILLIAMS, D.E., BROXMEYER, H.E., DUNN, J., FARRAH, T., JEFFERY, E., CLEVINGER, W., DEROSS, P., MARTIN, U., FRIEND, D., GRAIG, V., GAYLE, R., PRICE, V., COSMAN, D., MARCH, C.J. y PARK, L.S. (1991). "Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88: 5809-5813.
- CURRY, J.L. y TRENTIN, J.J. (1967). "Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation". Developmental Biology 5: 395-401.
- DAVATELIS, G., TEKAMPOLSON, P., WOLPE, S.D., HERMSEN, K., LEUDKE, C., GALLEGOS, C., COIT, D., MERRYWEATHER, J. y CERAMI, A. (1988). "Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP). A novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties". Journal of Experimental Medicine 167: 1939-1944.
- DEIMANN, W. y FAHIMI, H. (1980). "Induction of focal hemopoiesis in adult rat liver by glucan, a macrophage activator". Laboratory Investigations 42: 217-224.
- DeMAGALHAES-SILVERMAN, M., DONNENBERG, A.D., PINCUS, S.M. y BALL, E.D. (1993). "Bone marrow transplantation: a review". Cell Transplantation 2: 75-98.
- DENENKAMP, J. (1986). "Cell kinetics and radiation biology". International Journal of Radiation Biology 49: 357-380.
- DEXTER, T.M. y LAJTHA, L.G. (1974). "Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro". British Journal of Haematology 28: 525-530.
- DEXTER, T.M. y MOORE, M.A.S. (1977). "In vitro duplication and "cure" of haemopoietic defects in genetically anaemic mice". Nature 269: 412-414.
- DEXTER, T.M., ALLEN, T.D. y LAJTHA, L.J. (1977). "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro". Journal of Cellular Physiology 91: 335-344.
- DEXTER, T.M., SCHOFIELD, R., HENDRY, J.H. y TESTA, N.G. (1979). "Congenital and induced defects in haemopoietic environments, stem cell proliferation and differentiation". En: *Aplastic anaemia: Pathophysiology and approaches to therapy*. Heimpel, H., Gordon Smith, E.C., Heit, W. y Kubanek, B. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 73-78.

- DEXTER, T.M., GARLAND, J.M., SCOTT, D., SCOLNICK, E. y METCALF, D. (1980). "Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines". Journal of Experimental Medicine 152: 1036-1047.
- DEXTER, T.M., TESTA, N.G., ALLEN, T.D., RUTHERFORD, T. y SCOLNICK, E. (1981). "Molecular and cell biological aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures". Blood 56: 699-707.
- DEXTER, T.M., SPOONCER, E., SIMMONS, P. y ALLEN, T.D. (1984a). "Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience". En: *Long-Term Bone Marrow Culture*. Wright, D.W. y Greenberger, J.S. (Eds.). Alan R. Liss Inc, New York. pp. 57-96.
- DEXTER, T.M., SPOONCER, E., SCHOFIELD, R. y LORD, B.I. (1984b). "Haemopoietic stem cells and the problem of self-renewal". Blood Cells 10: 315-339.
- DEXTER, T.M. y WHITE, H. (1990). "Growth factors: growth without inflation" Nature 344: 380-381.
- DICK, J.E., MAGLI, M.C., HUSZAR, D., PHILLIPS, R.A. y BERNSTEIN, A. (1985). "Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W<sup>v</sup> mice". Cell 42: 71-79.
- DI GIOVINE, F.S. y DUFF, G.N. (1990). "Interleukin 1: The first interleukin". Immunology Today 11: 633-638.
- DINARELLO, C.A. (1989). "Interleukin-1 and its biologically related cytokines". Advances in Immunology 44: 153-205.
- DINARELLO, C.A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism". Blood 77: 1627-1652.
- DUNLOP, J.M., FIRKIN, F., McNIECE, I.K. y BERTONCELLO, I. (1993). "Accelerated establishment of murine long-term bone marrow cultures by addition of stem cell factor". Experimental Hematology 21: 769-773.
- DÜHRSEN, U., VILLEVAL, J.L., BOYD, J., KANNOURAKIS, G., MORSTYN, G. y METCALF, D. (1988). "Effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on hemopoietic progenitor cells in cancer patients". Blood 72: 2074-2081.
- EASTGATE, J., MOREB, J., NICK, H.S., SUZUKI, K., TANIGUCHI, N. y ZUCALI, J.R. (1993). "A role for manganese superoxide dismutase in radioprotection of hematopoietic stem cells by interleukin-1". Blood 81: 639-646.
- EAVES, C.J. y EAVES, A.C. (1978). "Erythropoietin (Ep) dose-response curves for three classes of erythroid progenitors in normal human bone marrow and in patients with polycythemia vera". Blood 52: 1196-1210.
- EAVES, A.C. y EAVES, C.J. (1984). "Erythropoiesis in culture". Clinical Haematology 13: 371-391.
- ECKMANN, L., FRESHNEY, M., WRIGHT, E.G., SPROUL, L., WILKIE, N. y PRAGNELL, I.B. (1988). "A novel in vitro assay for murine haematopoietic stem cells". British Journal of Cancer Suppl. 9: 36-40.



- ELIASON, J.F., THORENS, B., KINDLER, V. y VASSALLI, P. (1988). "The roles of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 in stromal cell-mediated hemopoiesis in vivo". Experimental Hematology 16: 307-312.
- ELKIND, M.M. (1977). "The initial part of the survival curve. Implications for low-dose, low-dose rate radiation responses". Radiation Research 71: 9-23.
- EPPSTEIN, D.A., VAN DER PAS, M.A., FRASER-SMITH, E.B., KURAHARA, C.G., FELGNER, P.L., MATTHEWS, T.R., WATERS, R.V., VENUTI, M.C., JONES, G.H., METHA, R. y LOPEZ-BERESTEIN, G. (1986). "Liposome-encapsulated muramyl dipeptide analogue enhances non-specific host immunity". International Journal of Immunotherapy 2: 115-126.
- FARRAR, M. y SCHREIBER, R.D. (1993). "Interferon- $\alpha$ ". Annual Reviews of Immunology 11: 571-593.
- FAUSSER, A.A. y MESSNER, H.A. (1979). "Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophil, granulocytes and erythroblast". Blood 53: 1023-1027.
- FEDEROCKO, P. (1994). "Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (MTP-PE) promotes haemopoietic recovery in irradiated mouse". International Journal of Radiation Biology 65: 465-475.
- FEINBERG, A.P. y VOGELSTEIN, B. (1983). "A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Analytical Biochemistry 132: 6-13.
- FIBBE, W.E., VANDAMME, J., BILIAU, A., GOSELINK, H.M., VOOGT, P.J., VANEIDEN, G., RALPH, P., ALTROCK, B.W. y FALKENBURG, J.H.F. (1988). "Interleukin 1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor". Blood 71: 430-435.
- FIDLER, I.J. (1985). "Macrophages and metastasis - a biological approach to cancer therapy: presidential address". Cancer Research 45: 4714-4726.
- FIDLER, I.J. (1986). "Immunomodulation of macrophages for cancer and antiviral therapy". En: *Site-specific drug delivery*. Tomlinson, E. y Davis, S.S. (Eds.). Chichester, Wiley. pp. 111-118.
- FLANAGAN, J.G. y LEDER, P. (1990). "The kit-ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts". Cell 63: 185-194.
- FLOERSHEIM, G.L. (1993). "Radioprotective effects of calcium antagonists used alone or with other types of radioprotectors". Radiation Research 133: 80-87.
- FONG, Y., TRACEY, K.J., MOLDAWER, L.L., HESSE, D.G., MANOGUE, K.B., KENNEY, J.S., LEE, A.T., KUO, G.C., ALLISON, A.C., LOWRY, S.F. y CERAMI, A. (1989). "Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduced interleukin 1b and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia". Journal of Experimental Medicine 170: 1627-1633.
- FRASCA, D., BASCHIERI, S., BORASHI, D., TAGLIABUE, A. y DORIA, G. (1991). "Radiation protection and restoration by the synthetic 163-171 nonapeptide of human interleukin-1b". Radiation Research 128: 43-47.

- FRASER, C.C., EAVES, C.J., SZILVASSY, J. y HUMPHRIES, R.K. (1990). "Expansion *in vitro* of retrovirally marked totipotent hematopoietic stem cell". Blood 76: 1071-1076.
- FRASER, C.C., SZILVASSY, J., EAVES, C.J. y HUMPHRIES, R.K. (1992). "Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells *in vitro* with retention of long-term competitive *in vivo* reconstituting ability". Proceedings of the National Academy of Science USA 89: 1968-1972.
- FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKLYAN, R.K., LATSINIK, N.V., PANSYUK, A.F. y KEILISS-BOROK, I.V. (1974). "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of hematopoietic tissue". Transplantation 17: 331-338.
- FRINDEL, E. y GUIGON, M. (1977). "Inhibition of CFU-entry into cycle by a bone marrow extract". Experimental Hematology 5: 74-76.
- FRINDEL, E. y MONPEZAT, J.P. (1989). "The physiological role of the endogenous colony forming units-spleen (CFU-S) inhibitor acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP)". Leukemia 3: 753-754.
- GALE, R.P. y REISNER, Y. (1988). "The role of bone-marrow transplants after nuclear accidents". The Lancet 1: 923-926.
- GALE, R.P. y BUTTURINI, A. (1990). "The role of hematopoietic growth factors in nuclear and radiation accidents". Experimental Hematology 18: 958-964.
- GALELLI, A. y CHEDID, L. (1983). "Induction of colony-stimulating activity (CSA) by a synthetic muramyl peptide (MDP): synergism with LPS and activity in C3H/HeJ mice and in endotoxin-tolerized mice". The Journal of Immunology 137: 3211-3215.
- GALLICCHIO, V.S. y CHEN, M.G. (1980). "Modulation of murine pluripotential stem cell proliferation *in vivo* by lithium carbonate". Blood 56: 1150-1152.
- GALLICCHIO, V.S., CHEN, M.G. y WATTS, T.D. (1984). "Ability of lithium to accelerate the recovery of granulopoiesis after subacute radiation injury". Acta Radiologica Oncology 23: 361-366.
- GALLICCHIO, V.S., HULETTE, B.C., MESSINO, M.J., GASS, C., BIESCHKE, M.W. y DOUKAS, M.A. (1989). "Effect of various interleukins (IL-1, IL-2, and IL-3) on the *in vitro* radioprotection of bone marrow progenitors (CFU-GM and CFU-MEG)". Journal of Biological Response Modifiers 8: 479-487.
- GANSER, A., LINDEMANN, A., SEIPELT, G., OTTMANN, O.G., HERRMANN, F., EDER, M., FRISCH, J., SCHULTZ, G., MERTELSMANN, R. y HOELZER, D. (1990). "Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with normal hematopoiesis and in patients with bone marrow failure". Blood 76: 666-676.
- GAULDIE, J., RICHARDS, C., HARNISH, D., LANSDORP, P. y BAUMANN, H. (1987). "Interferon  $\beta_2$ /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells". Proceedings of the National Academy of Science USA 84: 7251-7255.
- GAY, R.E., PRINCE, C.W., ZUCKERMAN, K.S. y GAY, S. (1989). "The collagenous hemopoietic microenvironment". En: *Handbook of the hematopoietic microenvironment*. Tavassoli, M. (Eds.). Humana Press, Clifton, New Jersey. pp. 369-398.

- GLASPY, J.A. y GOLDE, D.W. (1990). "Clinical trials of myeloid growth factors". Experimental Hematology 18: 1137-1141.
- GOLDE, D.W. (1984). "*Hematopoiesis*". Churchill Livingstone Inc, New York, Edinburgh, London, Melbourne.
- GORDON, M.Y., RILEY, G.P., WATT, S.M. y GREAVES, M.F. (1987). "Compartmentalization of a haemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment". Nature 326: 403-405.
- GORDON, M.Y. (1991). "Hemopoietic growth factors and receptors: bound and free". Cancer Cells 3: 127-132.
- GORDON, M.Y. y AMOS, T.A.S. (1994). "Stochastic effects in hemopoiesis". Stem Cells 12: 175-179.
- GOUGH, N.M., METCALF, D., GOUGH, J., GRAIL, D. y DUNN, A.R. (1985). "Structure and expression of the mRNA for murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor". The EMBO Journal 4(3): 645-653.
- GRANDE, T. (1988). "Estimulación proliferativa de células madre hematopoyéticas de ratón por actividades circulantes producidas durante la recuperación de un daño hematopoyético radioinducido". *Tesis Doctoral*. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- GRANDE, T., GONZALEZ, J., TEJERO, C., MAGANTO, G. y BUEREN J.A. (1990). "Production of humoral factors that stimulate spleen colony-forming units in mice irradiated with moderate doses of X rays". Radiation Research 122: 53-57.
- GRANDE, T., GAITAN, S., TEJERO, C. y BUEREN J.A. (1990). "Residual haematopoietic damage in adult and 8 day-old mice exposed to 7 Gy of X-rays". International Journal of Radiation Biology 63: 59-67.
- GRAHAM, G.J., WRIGHT, E.G., HEWICK, R., WOLPE, S.D., WILKIE, N.M., DONALSON, D., LORIMORE, S. y PRAGNEL, I.B. (1990). "Identification and characterization of an inhibitor of hemopoietic stem cell proliferation". Nature 344: 442-444.
- GREGORY, C.J. (1976). "Erythropoietic sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture". Journal of Cellular Physiology 89: 289-302.
- GROOPMAN, J.E., MITSUYASU, R.T., DELEO, M.J., OETTE, D.H., y GOLDE, D.W. (1987). "Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myelopoiesis in the acquired immunodeficiency syndrome". New England Journal of Medicine 317: 593-598.
- GROOPMAN, J.E. (1990). "Status of colony-stimulating factors in cancer and AIDS". Seminars in Oncology 17: 31-37.
- GUALTIERI, R.J., SHADDUCK, R.K. y QUESENBERRY, P.J. (1982). "Characteristics of hematopoietic regulatory factors produced by long-term bone marrow cultures". Blood 60 Suppl 1: 98-105.

- GUALTIERI, R.J., LIANG, C.M., SHADDUCK, R.K., WAHEED, A. y BANK, J. (1987). "Identification of the hematopoietic growth factors elaborated by bone marrow stromal cells using antibody neutralization analysis". Experimental Hematology 15: 883-889.
- GÜENECHÉA, G., ALBELLA, B., GUERRERO, A., BUEREN, J.A., MAGANTO, G. y REAL, A. (1994). "The hematopoietic stimulation induced by AM5, a protein associated polysaccharide, is mediated by hematopoietic growth factors". Experimental Hematology 22: 704 (Abstract).
- GÜENECHÉA, G., BUEREN, J.A., MAGANTO, G., TUDURI, P., GUERRERO, A., PIVEL, J.P. y REAL, A. (1995). "AM5, a protein-associated polysaccharide, stimulates the hematopoiesis and modulates the expression of endogenous hematopoietic growth factors in murine long-term bone marrow cultures". Stem Cells 13: 175-185.
- GUIGON, M., MARY, J.Y., ENOUF, J. y FRINDEL, E. (1982). "Protection of mice by CFU-S inhibitors against lethal doses of cytosine arabinoside". Cancer Research 42: 638-641.
- GUIGON, M., LEMOINE, F.M., DAINIAK, N., SCHECHTER, A. y NAJMAN, A. (1993). "*The negative regulation of hematopoiesis, from fundamental aspects to clinical applications*". Proceedings of the Third International Conference on Negative Regulation of Hematopoiesis. Colloques INSERM 229. Paris.
- GUZMAN, E. y LAJTHA, G. (1970). "Some comparisons of the kinetic properties of femoral and splenic haemopoietic stem cells". Cell Tissue Kinetics 3: 91-98.
- HADDEN, J.W. (1993). "Immunostimulants". Immunology Today 14: 275-280.
- HALL, E.J. (1988). "Acute effects of whole-body irradiation". En: *Radiobiology for the Radiologist*. Hall, E.J. (Eds.). Harper and Row Publishers. Lippincott, Philadelphia. pp 365-376.
- HAMMOND, W.P., CSIBA, E., CANIN, A., HOCKMAN, H., SOUZA, L.M., LAYTON, J.E. y DALE, D.C. (1991). "Chronic neutropenia: a new canine model induced by human G-CSF". Journal of Clinical Investigation 87: 704-710.
- HARA, H. y OGAWA, M. (1978). "Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages and megakaryocytes". American Journal of Hematology 4: 23-24.
- HARRISON, D.E. (1980). "Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity". Blood 55: 77-81.
- HARRISON, D.E., STONE, M. y ASTLE, C.M. (1990). "Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell". Journal of Experimental Medicine 172: 431-437.
- HARRISON, D.E., JORDAN, C.T., ZHONG, R.K. y ASTLE, C.M. (1993). "Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations". Experimental Hematology 21: 206-219.
- HEARD, J.M., FICHELSON, S. y VARAT, B. (1982). "Role of colony stimulating activity in murine long term bone marrow cultures: evidence for its production and consumption by the adherent cells". Blood 59: 761-767.

- HELLMAN, S. y BOTNICK, L.E. (1977). "Stem cell depletion: an explanation of the late effects of cytotoxins". International Journal of Radiation Biology Physics 2: 181-184.
- HENDRY, J.H. y LORD, B.I. (1983). "The analysis of the early and late response to cytotoxic insults in the haemopoietic cell hierarchy". En: *Cytotoxic Insult to tissue, effects on cell lineages*. Potten, C.S. y Hendry, J.H. (Eds.). Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York. pp 1-66.
- HENDRY, J.H., WANG, S.B. y TESTA, N.G. (1984). "Greater sparing of stromal progenitors cells than of haemopoietic stem cells in  $\gamma$ -irradiated mouse marrow using low dose-rates". Biomedicine & Pharmacology 38: 356-358.
- HENNEY, C.H. (1989). "Interleukin-7: Effects on early events in lymphopoiesis". Immunology Today 10: 170-173.
- HENON, P.R. (1993). "Peripheral blood stem cell transplantation: past, present and future". Stem Cells 11: 154-172.
- HESTDAL, K., WELTE, K., LIE, S.O., KELLER, J.R., RUSCETTI, F.W. y ABRAHAMSEN, T.G. (1990). "Severe congenital neutropenia: abnormal growth and differentiation of myeloid progenitors to granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) but normal response to G-CSF plus stem cell factor". Blood 82: 2991-2997.
- HEYWORTH, C.M., VALLANCE, S.J., WHETTON, A.D. y DEXTER, T.M. (1990). "The biochemistry and biology of the haemopoietic cell growth factors". Journal of Cell Sciences Suppl 13: 57-74.
- HIRANO, T., AKINA, S., TAGA, T. y KISHIMOTO, T. (1990). "Biological and clinical aspects of interleukin 6". Immunology Today 11: 443-449.
- HIROSE, K., LONGO, D.L., OPPENHEIM, J.J., MATSUSHIMA, K. (1993). "Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anti-cancer drugs, and ionizing radiation". FASEB Journal 7: 361-368.
- HODGSON, G.S. y BRADLEY, T.R. (1979). "Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell?". Nature 281: 381-382.
- HODGSON, J.S. y BRADLEY, T.R. (1984). "In vivo kinetic status of hematopoietic stem and progenitor cells as inferred from labelling with bromodeoxyuridine". Experimental Hematology 12: 683-687.
- HUANG, E., NOCKA, K., BEIER, D.R., CHU, T.Y., BUCK, J., LAHM, H.W., WELLNER, D., LEDER, P. y BESMER, P. (1990). "The hematopoietic growth factor KL is encoded by the SI locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus". Cell 63: 225-233.
- HUMPHRIES, R.K., JACKY, P.B., DILL, F.J. y EAVES, A.C. (1979). "CFU-S in individual erythroid colonies in vitro derived from adult mouse marrow". Nature 279: 718-720.
- HUMPHRIES, R.K., EAVES, A.L. y EAVES, C.J. (1981). "Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*". Proceedings of the National Academy of Science USA 78: 3629-3633.

- HUNT, P., ROBERTSON, D., WEISS, D., RENNICK, D., LEE, F. y WITTE, O.N. (1987). "A single bone marrow-derived stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells". Cell 48: 997-1007.
- IMAI, Y. y NAKAO, I. (1987). "In vivo radiosensitivity and recovery pattern of the hematopoietic precursor cells and stem cells in mouse bone marrow". Experimental Hematology 15: 890-895.
- IKEBUCHI, K., WONG, G.G., CLARK, S.C., IHLE, J.N., HIRAI, Y. y OGAWA, M. (1987). "IL-6 enhancement of IL-3 dependent proliferation of multipotential haemopoietic progenitors". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 9035-9039.
- ISCOVE, N. (1990). "Searching for stem cells". Nature 347: 126-127.
- ITOH, K., TEZUKA, H., SAKODA, H., KONNO, M., NAGATA, K., UCHIYAMA, T., UCHINO, H. y MORI, K.J. (1989). "Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow". Experimental Hematology 17: 145-153.
- JACOBS, K., SHOEMAKER, C., RUDERSDORF, R., NEILL, S.D., KAUFMAN, R.J., MUFSON, A., SEEHRA, J., JONES, S.S., HEWICK, R., FRITSCH, E.F., KAWAKITA, M., SHIMUZU, T. y MIYAKE, T. (1985). "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin". Nature 313: 806-810.
- JOHNKE, R.M. y ABERNATHY, R.S. (1991). "Accelerated marrow recovery following total-body irradiation after treatment with vincristine, lithium or combined vincristine-lithium". International Journal of Cell Cloning 9: 78-88.
- JOHNSON, G.R. y METCALF, D. (1977). "Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 3879-3882.
- JONES-VILLENEUVE, E.V. y PHILIPS, R.A. (1980). "Potentials for differentiation by cells from long-term cultures of bone marrow". Experimental Hematology 8: 65-76.
- JONES, R.J., CELANO, P., SHARKIS, S.J. y SENSENBRENNER, L.L. (1989). "Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice". Blood 73: 397-401.
- KARLSSON, S., BODINE, D.M., PERRY, L., PAPAYANNOPOULOU, Th. y NIENHIUS, A.W. (1988). "Expression of the human  $\beta$  globin gene following retroviral mediated gene transfer into multipotential hematopoietic progenitors of mice". Proceedings of the National Academy of Science USA 85: 6062-6066.
- KAWASAKI, E.S., LADNER, M.B., WANG, A.M., ARSDELL, J.V., WARREN, M.K., COYNE, M.Y., SCHWEICKART, V.L., LEE, M-T, WILSON, K.J., BOOSMAN, A., STANLEY, E.R., RALPH, P. y MARK, D.F. (1985). "Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1)". Science 230: 291-296.
- KEATING, A., SINGER, J., KILLEN, P., STRIKER, G.E., SALO, A.C., SANDERS, J., THOMAN, E.D., THORNING, D. y FIALKOW, P.J. (1982). "Evidence for donor origin of the *in vitro* hematopoietic microenvironment following marrow transplantation in man". Nature 298: 280-283.

- KELLER, G., PAIGE, C., GILBOA, E., WAGNER, E.F. (1985). "Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent hematopoietic precursor". Nature 318: 149-154.
- KELLER, J.R., JACOBSEN, S.E.W., DUBOIS, C.M., HESTDAL, K. y RUSCETTI, F.W. (1992). "Transforming growth factor- $\beta$ : a bidirectional regulator of hematopoietic cell growth". International Journal of Cell Cloning 10: 2-11.
- KINDLER, V., THORENS, B., KOSSODO, S., ALLET, B., ELIASON, J.F., THATCHER, D., FARBER, N. y VASSALLI, P. (1986). "Stimulation of hematopoiesis in vivo by recombinant bacterial murine interleukin 3". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83: 1001-1005.
- KING, A.G., TALMADGE, J.E., BADGER, A.M. y PELUS, L.M. (1992). "Regulation of colony stimulating activity production from bone marrow stromal cells by the hemoregulatory peptide, HP-5". Experimental Hematology 20: 223-228.
- KITTLER, E.L.W., McGRATH, H., TEMELES, D., CRITTEDEN, R.B., KISTER, V.K. y QUESENBERRY, P.J. (1992). "Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma". Blood 79: 3168-3178.
- KODAMA, H., SUDO, H., KOYAMA, H., KASAI, S. y YAMAMOTO, S. (1984). "In vitro hemopoiesis within a microenvironment created by MC3T3-G2/PA6 preadipocyte". Journal of Cellular Physiology 118: 233-240.
- KOEFFLER, H.P., GASSON, J., RANYARD, J., SOUZA, L., SHEPHERD, M. y MUNKER, R. (1987). "Recombinant human TNF $\alpha$  stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor". Blood 70: 55-59.
- KOMIYAMA, A., ISHIGURO, A., KUBO, T., MATSUOKA, T., YASUKOHCHI, S., YASUI, K., YANAGISAWA, M., YAMADA, S., YAMAZAKI, M. y AKABANE, T. (1988). "Increases in neutrophil counts by purified human urinary colony-stimulating factor in chronic neutropenia of childhood". Blood 71: 41-45.
- KOSSODO, S., GRAU, G.E., DANEWA, T., POINTAIRE, P., FOSSATI, L., ODY, C., ZAPP, J., PIGUET, P-F., GAILLARD, R.C. y VASSALLI, P. (1992). "Tumor necrosis factor  $\alpha$  is involved in mouse growth and lymphoid tissue development". Journal of Experimental Medicine 176: 1259-1264.
- KOURY, M.J. y PRAGNELL, I.B. (1987). "Retroviruses induce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity in fibroblasts". Nature 299: 638-640.
- KRANTZ, S.B. (1991). "Erythropoietin". Blood 77: 419-434.
- KRIEGLER, A.B., VERSCHOOR, S.M., BERNARDO, D. y BERTONCELLO, I. (1994). "The relationship between different high proliferative potential colony-forming cells in mouse bone marrow". Experimental Hematology 22: 432-440.
- KURHISHITA, A., KATOH, H., UEHARA, Y., UCHIDA, A., MIZUTANI, Y., ONO, T., HIROSE, S. y OKADA, S. (1991). "Post-irradiation treatment with OK432 can prevent radiation-induced bone marrow death". International Journal of Radiation Biology 59: 711-716.

- KURT-JONES, E.A., BELLER, D.I., MIZEL, S.B. y UNANUE, E.R. (1985). "Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82: 1204-1211.
- LADNER, M.B., MARTIN, G.A., NOBLE, J.A., WITTMAN, V.P., WARREN, M.K., McGROGAN, M. y STANLEY, E.R. (1988). "cDNA cloning and expression of murine macrophage colony-stimulating factor from L929 cells". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85: 6706-6710.
- LAJTHA, L.G., POZZI, L.V., SCHOFIELD, R. y FOX, M. (1969). "Kinetic properties of haemopoietic stem cells". Journal of Cellular Physiology 112: 411-418.
- LAJTHA, L.G., GILBERT, C.W. y GUZMAN, E. (1971). "Kinetics of haemopoietic colony growth". British Journal of Haematology 20: 343-353.
- LEHRACH, H., DIAMOND, D., WORZNEY, J.M. y BOEDTKER, H. (1977). "RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination". Biochemistry 16: 4743-4751.
- LENFANT, M., WDZIECZAK-BAKALA, J., GUITTET, E., PRONE, J.C., SOTTY, D. y FRINDEL E. (1989). "Inhibitor of haemopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 779-785.
- LEMISCHKA, I.R., RAULET, D.H. y MULLIGAN, R.C. (1986). "Developmental potential and dynamic behaviour of hematopoietic stem cells". Cell 45: 917-927.
- LEVIN, J. (1983). "Murine megakaryopoiesis *in vitro*: an analysis of culture systems used for the study of megakaryocyte colony-forming cells and of the characteristics of megakaryocyte colonies". Blood 61: 617-623.
- LEVITT, L.J. y QUESENBERRY, P.J. (1980). "The effect of Lithium on murine hematopoiesis in a liquid culture system". New England Journal of Medicine 302: 713-719.
- LI, C.L. y JOHNSON, G.R. (1992). "Rhodamine 123 reveals heterogeneity within murine Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> hemopoietic stem cells". Journal of Experimental Medicine 175: 1443-1447.
- LIESCHKE, G.J., STANLEY, E., GRAIL, D., HODGSON, G., SINICKAS, V., GALL, J.A.M., SINCLAIR, R.A. y DUNN, A.R. (1994). "Mice lacking both macrophage- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor have macrophages and coexistent osteopetrosis and severe lung disease". Blood 84: 27-35.
- LIPSCHITZ, D.A., UDUPA, K.B., TAYLOR, J.M., SHADDUCK, R.K. y WAHEED, A. (1987). "Role of colony-stimulating factor in myelopoiesis in murine long-term bone marrow cultures". Blood 69: 1211-1217.
- LOK, S., KAUSHANSKY, K., HOLLY, R.D., KUIJPER, J.L., LOFTON-DAY, C.E., OORT, P.J., GRANT, F.J., HEIPEL, M.D., BURKHEAD, S.K., KRAMER, J.M., BELL, L.A., SPRECHER, C.A., BLUMBERG, H., JOHNSON, R., PRUNKAD, D., CHING, A.F.T., MATHEWES, S.L., BAILEY, M.C., FORSTROM, J.W., BUDDLE, M.M., OSBORN, S.G., EVANS, S.J., SHEPPARD, P.O., PRESNELL, S.R., O'HARA, P.J., HAGEN, F.S., ROTH, G.J. y FOSTER D.C. (1994). "Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*". Nature 369: 565-568.



- LOMEDICO, P.T., GUBLER, U., HELLMANN, C.P., DUKOVICH, M., GIRI, J.G., PAN, Y.E., COLLIER, K., SEMIONOW, R., CHUA, A.O. y MIZEL, S.B. (1984). "Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*". Nature 312: 458-461.
- LONG, M.W. (1993). "Population heterogeneity among cells of the megakaryocyte lineage". Stem Cells 11: 33-40.
- LORD, B.I. y WRIGHT, E.G. (1982). "Interaction of inhibitor and stimulator in the regulation of CFU-S proliferation". Leukemia Research 6: 541-551.
- LORD, B.I., MOLINEUX, G., TESTA, N.G., KELLY, M., SPOONER, E. y DEXTER, T.M. (1986). "The kinetic response of haemopoietic precursor cells in vivo, to highly purified, recombinant interleukin-3". Lymphokine Research 5(2): 97-104.
- LORD, B.I. y TESTA, N.G. (1988). "The hemopoietic system: structure and regulation" En: *Hematopoiesis: Long effects of chemotherapy and radiation*. Testa, N.G. y Gale, R.P. (Eds.). Marcel Dekker, New York, Basel. pp. 1-26.
- LORD, B.I. (1993). "In vivo assays for multipotential and marrow repopulating cells". En: *Haemopoiesis: a practical approach*. Testa, N.G. y Molineux, G. (Eds.). Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo. pp. 1-19.
- LORIMORE, S.A., PRAGNELL, I.B., ECKMANN, L. y WRIGHT, E.G. (1990). "Synergistic interactions allow colony formation in vitro by murine haemopoietic stem cells". Leukaemia Research 14: 481-489.
- LYMAN, S.D., JAMES, L., BOS, T.V., deVRIES, P., BRASEL, K., GLINIAK, B., HOLLINGSWORTH, L.T., PICH, K.S., McKENNA, H.J., SPLETT, R. R., FLETCHER, F.A., MARASKOVSKY, E., FARRAH, T., FOXWORTHE, D., WILLIAMS, D.E. y BECKMANN, M.P. (1993). "Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells". Cell 75: 1157-1167.
- MAGANTO, G. (1985). "Efectos letales de la hipertermia y de las radiaciones ionizantes sobre las células cepa hematopoyéticas de ratón". *Tesis Doctoral*. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- MAGLI, M.C., ISCOVE, N.N. y ODARTCHENKO, N. (1982). "Transient nature of early haemopoietic spleen colonies". Nature 295: 527-529.
- MAISIN, J.R., KONDI-TAMBA, A. y MATTELIN, G. (1986). "Polysaccharides induce radioprotection of murine hemopoietic stem cells and increase the LD50/30 days". Radiation Research 105: 276-281.
- MAISIN, J.R., ALBERT, C. y HENDRY, A. (1993). "Reduction of short-term radiation lethality by biological response modifiers alone or in association with other chemical protectors". Radiation Research 135: 332-337.
- MASAOKA, T., TAKAKU, F., KATO, S., MORIYAMA, Y., KODERA, Y., KANAMARU, A., SHIMOSAKA, A., SHIBATA, H. y NAKAMURA, H. (1989). "Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in allogenic bone marrow transplantation". Experimental Hematology 17: 1047-1050.

- MAYER, P., LAM, C., OBENAU, H., LIEHL, E. y BESEMER, J. (1987). "Recombinant human GM-CSF induces leukocytosis and activates peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in nonhuman primates". Blood 70: 206-213.
- McCULLOCH, E.A., SIMINOVITCH, L.E. y TILL, J.E. (1964). "Spleen colony formation in anaemic mice of genotype W/Wv". Science 144: 844-846.
- McCULLOCH, E.A., SIMINOVITCH, L.E., RUSSELL, E.S. y BERNSTEIN, S.E. (1965). "The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anaemic mice of genotype SI/SId". Blood 26: 399-410.
- McCULLOCH, E.A. (1980). "Hemopoietic stem cell differentiation". Biochimistry Biophysics Acta 605: 431-459.
- McCUSKEY, R.S., MEINEKE, H.A. y TOWNSEND, S.F. (1972). "Studies of the haemopoietic microenvironment I. Changes in the microvascular system and stroma during erythropoietic regeneration and supression in the spleen of CF1 mice". Blood 39: 697-712.
- McDONALD, T.P. y SULLIVAN, P.S. (1993). "Megakaryocyte and erythrocytic cell lines share a common precursor cell". Experimental Hematology 21: 1316-1320.
- McGRATH, H.E., WADE, P.M., KISTER, V.K. y QUESENBERRY, P.J. (1992). "Lithium stimulation of HPP-CFC and stromal growth factor production in murine Dexter culture". Journal of Cellular Physiology 151: 276-286.
- McINTOSH, J.K., JABLONS, D.M., MULE, J.J., NORDAN, R.P., RUDIKOFF, S., LOTZE, M.T. y ROSENBERG, S.A. (1989). "In vivo induction of IL-6 by administration of exogenous cytokines and detection of *de novo* serum levels of IL-6 in tumor-bearing mice". The Journal of Immunology 143: 162-167.
- McLEOD, D.L., SHREEVE, M.M. y AXELRAD, A.A. (1980). "Chromosome marker evidence for bipotentiality of BFU-e". Blood 56: 318-322.
- McNIECE, I.K., BRADLEY, T.R., KRIEGLER, A.A. y HODGSON, G.S. (1986). "Subpopulations of mouse bone marrow high-proliferative-potential colony-forming cells". Experimental Hematology 14: 856-862.
- McNIECE, I.K., WILLIAMS, N.T., JOHNSON, G.R., KRIEGLER, A.B., BRADLEY, T.R. y HODGSON, G.S. (1987). "Generation of murine hematopoietic precursor cells from macrophage high-proliferative potential colony-forming cells". Experimental Hematology 15: 972-977.
- McNIECE, I.K., BERTONCELLO, I., KRIGLER, A.B. y QUESENBERRY, P.J. (1990). "Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). International Journal of Cell Cloning 8: 141-160.
- McNIECE, I.K., STEWART, F.M., DEACON, D.M. y QUESENBERRY, P.J. (1991). "Synergistic interactions between hematopoietic growth factors as detected by *in vitro* mouse bone marrow colony formation". Experimental Hematology 16: 383-392.

- McNIECE, I.K., BERTONCELLO, I., KELLER, J.R., RUSCETTI, F.W., HARTLEY, C.A., ZSEBO, K.M. (1992). "Transforming growth factor  $\beta$  inhibits the action of stem cell factor on mouse and human hematopoietic progenitors". International Journal of Cell Cloning 10: 80-86.
- MEFFERD, R.B., HENKEL, D.J. y LOEFFER, J.B. (1953). "Effect of Piromen on survival in irradiated mice". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 83: 54-56.
- MEIJNE, I.M., WINDEN-VAN GROENEWEGEN, R.J.M., PLOEMACHER, R.E., VOS, O., DAVID, J.A.G. y HUISKAMP, R. (1991). "The effects of X-irradiation on hematopoietic stem cell compartments in the mouse". Experimental Hematology 19: 617-623.
- METCALF, D. y MOORE, M.A.S. (1971), "Embryonic aspects of haemopoiesis". En: *Haemopoietic cells*. Neuberger, A. y Tatum, E.L. (Eds.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London. pp. 172-271.
- METCALF, D. (1971). "Inhibition of bone marrow colony formation *in vitro* by dialysable products of normal and neoplastic hemopoietic cell". Australian Journal of Experimental Biology and Medicine Science 49: 351-363.
- METCALF, D. (1972). "Effect of thymidine suicing in colony formation in vitro by mouse hematopoietic cells". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 139: 511-514.
- METCALF, D., PARKER, J.W., CHESTER, H.M. y KINCADE, P.W. (1974). "Formation of eosinophilic-like granulocyte colonies by mouse bone marrow cells *in vitro*". Journal of Cellular Physiology 84: 275-290.
- METCALF, D. y McDONALD, H.R. (1975). "Heterogeneity of in vitro colony and cluster-forming cells in the mouse marrow. Segregation by velocity sedimentation". Journal of Cellular Physiology 85: 643-653.
- METCALF, D., McDONALD, H.R., ORDARTCHENKO, N.Y. y SORDAT, B. (1975). "Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 72: 1744-1748.
- METCALF, D., JOHNSON, G.R. y MANDEL, T.E. (1979). "Colony formation in agar by multipotential haemopoietic cells". Journal of Cellular Physiology 98: 401-420.
- METCALF, D. (1980). "Clonal analysis of the proliferation and differentiation of paired daughter cells: Action of the granulocyte-macrophage precursors". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77: 5327-5330.
- METCALF, D., JOHNSON, G.R. y BURGESS, A.W. (1980). "Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells". Blood 55: 138-147.
- METCALF, D. y MERCHAV, S. (1982). "Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocyte and macrophages". Journal of Cellular Physiology 112: 411-418.
- METCALF, D. y NICOLA, N.A. (1983). "Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells". Journal of Cellular Physiology 116: 198-206.

- METCALF, D. (1984a). "The bioassay of colony stimulating factors". En: *The Hemopoietic Colony Stimulating Factors*. Metcalf, D. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. pp. 187-189.
- METCALF, D. (1984b). "The colony stimulating factors". En: *The Hemopoietic Colony Stimulating Factors*. Metcalf, D. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. pp. 55-92.
- METCALF, D. y NICOLA, N.A. (1991). "Direct proliferative actions of stem cell factor on murine bone marrow cell *in vitro*. Effects of combination with colony-stimulating factors". Proceedings of the National Academy of Science USA 88: 11310-11316.
- METCALF, D. (1991). "The leukemia inhibitory factor (LIF)". International Journal of Cell Cloning 9: 95-108.
- METCALF, D. (1992). "Hemopoietic regulators". Trends in Biological Sciences 17: 286-289.
- METCALF, D. (1993). "Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?". Blood 82: 3515-3523.
- METCALF, D. (1994). "Thrombopoietin-at last". Nature 369: 519-520.
- MIGLIACCIO, G., MIGLIACCIO, A.R., VALINSKY, J., LANGLEY, K., ZSEBO, K., VISSER, J.W.M. y ADAMSON, J.W. (1991). "Stem cell factor induces proliferation and differentiation of highly enriched murine hematopoietic cells". Proceedings of the National Academy of Science USA 88: 7420-7432.
- MINAMI, Y. (1993). "The IL-2 receptor complex. Its structure, function and target genes". Annual Reviews of Immunology 11: 245-267.
- MINGUELL, J.J. y TAVASSOLI, M. (1989). "Proteoglycan synthesis by hemopoietic progenitor cells". Blood 73: 1821-1827.
- MINGUELL, J.J., HARDY, C. y TAVASSOLI, M. (1992). "Membrane-associated chondroitin sulfate proteoglycan and fibronectin mediate the binding of hemopoietic progenitor cells to stromal cells". Experimental Cell Research 201: 200-207.
- MIURA, N., OKADA, S., ZSEBO, K.M., MIURA, Y. y SUDA, T. (1993). "Rat stem cell factor and IL-6 preferentially support the proliferation of c-kit-positive murine hemopoietic cells rather than their differentiation". Experimental Hematology 21: 143-149.
- MIYANOMAE, T. y FRINDEL, E. (1988). "Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax senticosus* Harms (Shigoka) administered before or after irradiation". Experimental Hematology 16: 801-806.
- MIZEL, S.B. y MIZEL, D. (1981). "Purification to apparent homogeneity of murine IL-1". The Journal of Immunology 126: 834-837.
- MIZUNO, K., HIGUCHI, O., IHLE, J.N. y NAKAMURA, T. (1993). "Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitors cells". Biochemical and Biophysical Research Communications 194: 178-186.
- MOCHIZUKI, D.Y., EISENMAN, J.R., CONLON, P.J., LARSEN, A.D. y TUSHINSKI, R.J. (1987). "Interleukin-1 regulates hematopoiesis activity, a role previously ascribed to hemopoietin-1". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 5267-5271.

- MOLINEUX, G., POJDA, Z. y DEXTER, T.M. (1990). "A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor". Blood 75: 563-569.
- MOLINEUX, G., MIGDALSKA, A., SZMITKOWSKI, M., ZSEBO, K. y DEXTER, T.M. (1991). "The effects on hematopoiesis of recombinant stem cell factor (ligand of c-kit) administered in vivo to mice either alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor". Blood 78: 961-966.
- MOORE, M.A.S. (1991). "Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators". Blood 78: 1-19.
- MORRIS, C.F., YOUNG, I.A. y HAPPEL, A.J. (1990). "Molecular and Cellular Biology of Interleukin-3". En: *Colony-Stimulating Factors. Molecular and Cellular Biology*. Dexter, T.M., Garland J.M. y Testa, N.G. (Eds.). Immunology series, 49. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel. pp. 177-214.
- MORRISEY, P., CHARRIER, K., BRESSLER, L. y ALPERT, A. (1988). "The influence of IL-1 treatment on the reconstitution of the hemopoietic and immune systems after sublethal radiation". The Journal of Immunology 140: 4204-4210.
- MOTOYOSHI, K., TAKAKU, F., MAEKAWA, T., MIURA, Y., KIMURA, K., FURUSAWA, S., HATTON, M., NOMURA, T., MIZOGUCHA, H., OGAWA, M., KINUGASA, K., TOMINAGA, T., SHIMOYAMA, M., DEURA, K., OHTA, K., TAGUCHI, T., MASAUKA, T. y KIMURA, I. (1986). "Protective effect of partially purified human urinary colony-stimulating factor on granulocytopenia after antitumor chemotherapy". Experimental Hematology 14: 1069-1075.
- MUNKER, R., GASSON, J., OGAWA, M. y KOEFFLER, H.P. (1986). "Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor". Nature 323: 79-82.
- MUSASHI, M., CLARK, S.C., SUDO, T., URDAL, D.L. y OGAWA, M. (1991). "Synergistic interactions between interleukin-11 and interleukin-4 in support proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice". Blood 78: 1448-1451.
- NAKAHATA, T. y OGAWA, H. (1982a). "Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capacity to self renew and generate multipotential hemopoietic colonies". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 79: 3843-3847.
- NAKAHATA, T. y OGAWA, M. (1982b). "Clonal origin of murine hemopoietic colonies with apparent restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GMM) differentiation". Journal of Cellular Physiology 111: 239-246.
- NEGRIN, R.S., HAEUBER, D.H., NAGLER, A., KOBAYASHI, Y., SKLAR, J., DONLON, T., VINCENT, M. y GREENBERG, P.L. (1990). "Maintenance treatment of patients with myelodysplastic syndrome using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor". Blood 76: 36-43.
- NEMUNAITIS, J., SINGER, J.W., BUCKER, C.D., HILL, R., STORB, R., THOMAS, E.D. y APPELBAUM, F.R. (1988). "Use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in autologous marrow transplantation for lymphoid malignancies". Blood 72: 834-836.

- NETA, R., DOUCHES, S. y OPPENHEIM, J.J. (1986). "Interleukin 1 is a radioprotector". The Journal of Immunology 136: 2483-2485.
- NETA, R., SZTEIN, M.B., OPPENHEIM, S., GILLIS, S. y DOUCHES, S.D. (1987). "The *in vivo* effects of IL-1. I. Bone marrow cells are induced to cycle after administration of IL-1". Journal of Immunology 139: 1861-1866.
- NETA, R. y OPPENHEIM, J.J. (1988). "Cytokines in therapy of radiation injury". Blood 72: 1093-1095.
- NETA, R., OPPENHEIM, F.F. y DOUCHES, S.D. (1988a). "Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin 1, tumor necrosis factor, granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". The Journal of Immunology 140: 108-111.
- NETA, R., VOGEL, S.N., SIPE, J.D., WONG, G.G. y NORDAN, R.P. (1988b). "Comparison of *in vivo* effects human recombinant IL-1 and human recombinant IL-6 in mice". Lymphokine Research 7: 403-411.
- NETA, R., VOGEL, S.N., PLOCINSKI, J.M., TARE, N.S., BENJAMIN, W., CHIZZONITE, R. y PILCHER, M. (1990). "*In vivo* modulation with anti-interleukin-1 (IL-1) receptor (p80) antibody 35F5 of the response to IL-1. The relationship of radioprotection, colony stimulating factor, and IL-6". Blood 76: 57-62.
- NETA, R., OPPENHEIM, J.J., SCHREIBER, R.D., CHIZZONITE, R., LEDNEY, G.D. y McVITTIE, T.J. (1991). "Role of cytokines (interleukin 1, tumor necrosis factor, and transforming growth factor  $\beta$ ) in natural and lipopolysaccharide-enhanced radioresistance". Journal of Experimental Medicine 173: 1177-1182.
- NETA, R., PERLSTEIN, R., VOGEL, S.N., LEDNEY, G.D. y ABRAMS, J. (1992). "Role of interleukin 6 (IL-6) in protection from lethal irradiation and in endocrine responses to IL-1 and tumor necrosis factor". The Journal of Experimental Medicine 175: 689-694.
- NETA, R., WILLIAMS, D., SELZER, F. y ABRAMS, J. (1993). "Inhibition of c-kit ligand/Steel factor by antibodies reduces survival of lethally irradiated mice". Blood 81: 324-327.
- NICOLA, N.A. (1989). "Hemopoietic cell growth factors and their receptors". Annual Reviews of Biochemistry 58: 45-77.
- NISHIGUCHI, I., FURUTA, Y., HUNTER, N., MURRAY, D. y MILAS, L. (1990). "Radioprotection of hematopoietic tissues in mice by indomethacin". Radiation Research 122: 188-192.
- NOMOTO, K., YOKOKURA, T., TSUNEOKA, K. y SHIKITA, M. (1991). "Radioprotection in mice by a single subcutaneous injection of heat-killed *Lactobacillus casei* after irradiation". Radiation Research 125: 293-297.
- ODELL, T.T. y McDONALD, T.P. (1961). "Life span of mouse blood platelets". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 106: 107-108.
- OGAWA, M., PORTER, P.N. y NAKAHATA, T. (1983). "Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (an interpretative review)". Blood 61: 823-829.

- OPPENHEIM, J.J. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene *intercrine* cytokine family". Annual Reviews of Immunology 9: 617-648.
- PATCHEN, M.L. y McVITTIE, T.J. (1983). "Temporal response of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells to low-dose glucan treatment". Acta Haematologica 79: 281-288.
- PATCHEN, M.L., DI LUZIO, N.R., JACQUES, P. y McVITTIE, T.J. (1984). "Soluble polyglycans enhance recovery from cobalt-60-induced hemopoietic injury". Journal of Biological Response Modifiers 3: 627-633.
- PATCHEN, M.L. y McVITTIE, T.J. (1985). "Stimulated hemopoiesis and enhanced survival following glucan treatment in sublethally and lethally irradiated mice". International Journal of Immunopharmacology 7(6): 923-932.
- PATCHEN, M.L. y McVITTIE, T.J. (1986a). "Hemopoietic effects of intravenous soluble glucan administration". Journal of Immunopharmacology 8: 407-425.
- PATCHEN, M.L. y McVITTIE, T.J. (1986b). "Comparative effects of soluble and particulate glucans on survival in irradiated mice". Journal of Biological Response Modifiers 5: 45-60.
- PATCHEN, M.L., D'ALESSANDRO, M.M., BROOK, I., BLAKELY, W.F. y McVITTIE, T.J. (1987). "Glucan: Mechanisms involved in its radioprotective effect" Journal of Leukocyte Biology 42: 95-105.
- PATCHEN, M.L., McVITTIE, T.J. y JACKSON, W.E. (1989). "Postirradiation glucan administration enhances the radioprotective effects of WR-2721". Radiation Research 117: 59-69.
- PATCHEN, M.L., McVITTIE, T.J., SOLBERG, B.D. y SOUZA, L.M. (1990). "Therapeutic administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor accelerates hemopoietic regeneration and enhances survival in a murine model of radiation-induced myelosuppression". International Journal of Cell Cloning 8: 107-122.
- PATCHEN, M.L., McVITTIE, T.J., WILLIAMS, J.L., SCHWARTZ, G.N. y SOUZA, L.M. (1991). "Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression". Blood 77: 472-480.
- PATCHEN, M.L., FISCHER, R., SCHMAUDER-CHOCK, E.A. y WILLIAMS, D.E. (1994). "Mast cell growth factor enhances multilineage hematopoietic recovery *in vivo* following radiation-induced aplasia". Experimental Hematology 22: 31-39.
- PAUKOVITS, W.R. y LAERUM, O.D. (1982). "Isolation and synthesis of a hemoregulatory peptide". Z. Naturforsch 37: 1297-1300.
- PAUKOVITS, W.R., HERGL, A. y SCHULTE-HERMANN, R. (1990). "Hemoregulatory peptide pGlu-Glu-Asp-Cys-Lys (pEEDCK): a new synthetic derivative for avoiding dimerization and loss of inhibitory activity". Molecular Pharmacology 38: 401-409.
- PAUKOVITS, W.R., MOSER, M.H., BINDER, K.A. y PAUKOVITS, J.B. (1991). "Protection from arabinofuranosylcytosine and n-mustard-induced myelotoxicity using hemoregulatory peptide pGlu-Glu-Asp-Cys-Lys monomer and dimer". Blood 77: 1313-1319.

- PAUL, W.E. (1991). "IL-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine". Blood 77: 1859-1870.
- PEACOCK, J.H., STEEL, G.G. y STEPHENS, T.C. (1986). "Radiation dose-rate dependent differences in cell kill and repopulation in murine bone marrow CFU-S and CFU-C". British Journal of Cancer 53: 171-173.
- PELUS, L.M., KING, A.G., BROXMEYER, H.E., DEMARSH, P.L., PETTEWAY, S.R. y BHATNAGAR, P.K. (1994). "In vivo modulation of hematopoiesis by a novel hematoregulatory peptide". Experimental Hematology 22: 239-247.
- PENNICA, D., HAYFLICK, J.S., BRINGMAN, T.S., PALLADINO, M.A. y GOEDDE, D.V. (1985). "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for mTNF". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82: 6060-6064.
- PETERS, C., O'SHEA, K.S., CAMPBELL, A.D., WIHA, M.S. y LONG, M.W. (1990). "Fetal expression of hemonectin: an extracellular matrix hematopoietic cytoadhesion molecule". Blood 75: 357-365.
- PHARR, P.N., SUDA, T., BERGMANN, K.L., AVILA, L.A. y OGAWA, M. (1984). "Analysis of pure and mixed murine mast cell colonies". Journal of Cellular Physiology 120: 1-12.
- PIVEL, J.P. y MUÑOZ, E. (1994). "Glicobiología: un camino hacia la especialización en biotecnología". Mundo Científico 14: 248-255.
- PLOEMACHER, R.E. y BRONS, N.H.C. (1989). "Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation: evidence for a pre-CFU-S cell". Experimental Hematology 17: 263-266.
- PLOEMACHER, R.E., VAN DER SLUIJS, J.P., VOERMAN, J.S.A. y BRONS, N.H.C. (1989). "An in vitro limiting dilution assay of long-term repopulating stem cells in the mouse". Blood 74: 2755-2763.
- PLOEMACHER, R.E., VAN DER SLUIJS, J.P., VAN BEURDEN, C.A.J., BAERT, M.R.M. y CHAN, P.L. (1991). "Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow repopulating and spleen colony forming hemopoietic stem cells in the mouse". Blood 78: 200-206.
- PLOEMACHER, R.E., VAN OS, R., VAN BEURDEN, C.A.J. y DOWN, J.D. (1992). "Murine haemopoietic stem cells with long-term engraftment and marrow repopulating ability are more resistant to gamma-radiation than are spleen colony forming cells". International Journal of Radiation Biology 61: 489-499.
- PLUMB, M., GRAHAM, G.J., GROVE, M., REID, A. y PRAGNELL, I.B. (1991). "Molecular aspects of a negative regulator of haemopoiesis". British Journal of Cancer 64: 990-992.
- POJDA, Z., MOLINEUX, G. y DEXTER, T.M. (1990). "Hemopoietic effects of short-term in vivo treatment of murine with various doses of rhG-CSF". Experimental Hematology 18: 27-31.
- POJDA, Z., AOKI, Y., SOBIXZEWSKA, E., MACHAJ, E. y TSUBOI, A. (1992). "In vivo administration of interleukin 6 delays hematopoietic regeneration in sublethally irradiated mice". Experimental Hematology 20: 862-867.



- PRAGNELL, I.B., WRIGHT, E.G., LORIMORE, S.A., ADAM, J., ROSENDAAL, M., DELAMARTER, J.F., FRESHNEY, M., ECKMANN, L., SPROUL, L. y WILKIE, N. (1988). "The effect of stem cell proliferation regulators demonstrated with an in vitro assay". Blood 72: 196-201.
- PURDIE, J.W., INHABER, E.R., SCHNEIDER, H. y LABELLE, J.L. (1983). "Interaction of cultured mammalian cells with WR-2721 and its thiol, WR-1065. Implications for mechanisms of radioprotection". International Journal of Radiation Biology 43: 517-527.
- QUESENBERRY, P.J. (1986). "Synergistic hematopoietic growth factors". International Journal of Cell Cloning 4: 3-15.
- QUESENBERRY, P.J. (1990). "Stromal cells in long-term bone marrow cultures". En: *Handbook of the hemopoietic microenvironment*. Tavassoli, M. (Eds.). Humana Press, Clifton, New Jersey. pp. 253-285.
- RAMIREZ, J.C. (1992). "RNA antisentido: una aproximación de resistencia genética a parvovirus". *Tesis Doctoral*. Facultad de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.
- REAL, A. (1991). "Estimulación hematopoyética inducida por un modificador de la respuesta biológica de naturaleza polisacárido-proteína". *Tesis Doctoral*. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- REAL, A., GÜENECHÉA, G., BUEREN, J.A. y MAGANTO, G. (1992). "Radioprotection mediated by the hemopoietic stimulation conferred by AM5: a protein-associated polysaccharide". International Journal of Radiation Biology 62: 65-72.
- REIMANN, J. y BURGER, H. (1979). "In vitro proliferation of haemopoietic cells in presence of adherent cell layers. II. Differential effect of adherent layers derived from different organs". Experimental Hematology 7: 52-58.
- RENNICK, D., YOUNG, G., GEMMELL, L. y LEE, F. (1987). "Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors GM-CSF and G-CSF". Blood 69: 682-691.
- RETTENMIER, C.W., ROUSSEL, M.F., ASHMUN, R.A., RALPH, P., PRICE, K. y SHERR, C.J. (1987). "Synthesis of membrane-bound colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and downmodulation of CSF-1 receptors in NIH-3T3 cells transformed by cotransfection of the human CSF-1 and c-fms (CSF-1 receptor) genes". Molecular and Cellular Biology 7: 2378-2387.
- ROBERTS, R.G., GALLAGHER, J., SPOONER, E., ALLEN, T., BLOOMFIELD, F. y DEXTER, T.M. (1988). "Heparan sulfate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis". Nature 332: 376-378.
- ROSS, W.M. y PEEKE, J. (1986a). "Radioprotection conferred by dextran sulphate given before irradiation in mice". Experimental Hematology 14: 147-155.
- ROSS, W.M. y PEEKE, J. (1986b). "Haemopoietic radioprotection by dextran sulphate in mice". British Journal of Cancer 53 Suppl. VII: 126-129.

- SAMAL, B., SUN, Y., STEARNS, G., XIE, C., SUGGS, S. y McNIECE, I. (1994). "Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor". Molecular and Cellular Biology 14: 1431-1437.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- SANDERSON, C.J., WARREN, D.J. y STRATH, M. (1985). "Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation *in vitro*. Its relationship to IL-3, and functional properties of eosinophils produced in cultures". Journal of Experimental Medicine 162: 60-74.
- SANDERSON, C.J., CAMPBELL, H.D. y YOUNG, I.G. (1988). "Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (Interleukin-5) and its effects on human and mouse B cells". Immunology Reviews 102: 29-50.
- SAUVAGE, F.J., HASS, P.E., SPENCER, S.D., MALLOY, B.E., GURNEY, A.L., SPENCER, S.A., DARBONNE, W.C., HENZEL, W.J., WONG, S.C., KUANG, W.J., OLES, K.J., HULTGREN, B., SOLBERG, L.A., GOEDDEL, D.V. y EATON, D.L. (1994). "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand". Nature 369: 533-538.
- SCHOFIELD, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell: a hypothesis". Blood Cells 4: 7-25.
- SCHOFIELD, R., LORD, B.I., KYFFIN, S. y GILBERT, C.W. (1980). "Self-maintenance capacity of CFU-S". Journal of Cellular Physiology 103: 355-368.
- SCHOOLEY, J.C. y GARCÍA, J.F. (1962). "Immunologic studies on the mechanism of action of erythropoietin". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 110: 636-645.
- SCHUMMAN, G., VAN HOOGEVEST, P., FANKHAUSER, P., PROBST, A., PEIL, A., COURT, M., SCHAFFNER, J.C., FISCHER, M., SKRIPSKY, T. y GRAEPEL, P. (1989). "Comparison of free and liposomal MTP-PE: pharmacological, toxicological and pharmacokinetics aspects". En: *Liposomes in the therapy of infectious diseases and cancer*. López-Berestein, G. y Fidler, I.J. (Eds.). New York, Liss. pp. 191-203.
- SCHWARTZ, G.N., McVITTIE, T.J., VIGNEULLE, R.M., PATCHEN, M.L., DOUCHES, S.D., OPPENHEIM, J.J. y NETA, R. (1987). "Enhanced hematopoietic recovery in irradiated mice pretreated with interleukin-1 (IL-1)". Immunopharmacology and Immunotoxicology 9: 371-389.
- SCHWARTZ, G.N., NETA, R., VIGNEULLE, R.M., PATCHEN, M.L. y McVITTIE, T. J. (1988). "Recovery of hematopoietic colony-forming cells in irradiated mice pretreated with interleukin-1 (IL-1)". Experimental Hematology 16: 752-757.
- SCHWARTZ, G.N. (1989). "Radioprotection of mice with interleukin-1: relationship to the number of splenic colony-forming units". Radiation Research 119: 101-112.
- SCOTT, P. (1993). "Interleukin-12". Science 260: 696-697.

- SEELENTAG, W.K., MERMED, J.J., MONTESANO, R. y VASSALLI, P. (1987). "Additive effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  on the accumulation of the three granulocyte and macrophage colony-stimulating factor mRNAs in human endothelial cells". EMBO Journal 6: 2261-2275.
- SEGOVIA, J.C., REAL, A., BUEREN, J.A. y ALMENDRAL, J.M. (1991). "In vitro myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) on hematopoietic and committed progenitor cells". Blood 77: 980-988.
- SHADDUCK, R.K. (1976). "Leukocyte colony-stimulating factor and inhibitor activity". Journal of Laboratory and Clinical Medicine 87: 1041-1049.
- SHADDUCK, R.K., WAHEED, A., GREENBERGER, J.S. y DEXTER, T.M. (1983). "Production of colony stimulating factor in long-term bone marrow cultures". Journal of Cellular Physiology 114: 88-92.
- SILVA, M.R.G., KESSLER, S. y ASCENSAO, J.L. (1993). "Hematopoietic origin of human natural killer (NK) cells: generation from immature progenitors". Pathobiology 61: 247-255.
- SIMINOVITCH, L., McCULLOCH, E.A. y TILL, J.E. (1963). "Distributions of colony-forming cells among spleen colonies". Journal of Cellular Comp. Physiology 62: 327-336.
- SINCLAIR, W.K. y MORTON, R.A. (1966). "X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured chinese hamster cells". Radiation Research 29: 450-474.
- SLORDAL, L., MUENCH, M.O. y WARREN, D.J. (1989). "Radioprotection by murine and human tumor-necrosis factor: dose-dependent effects on hematopoiesis in the mouse". European Journal of Haematology 43: 428-434.
- SMITH, K.A. (1988). "Interleukin-2: Inception, impact and implication". Science 240: 1169-1176.
- SMOLUK, G.D., FAHEY, R.C. y WARD, J.F. (1986). "Equilibrium dialysis studies of the binding of radioprotector compounds to DNA". Radiation Research 107: 194-204.
- SNOECK, H-W, BOCKSTAELE, D.R., NYS, G., LENJOU, M., LARDON, F., HAENEN, L., RODRIGUS, I., PEETERMANS, M.E. y BERNEMAN, Z.N. (1994). "Interferon  $\gamma$  selectively inhibits very primitive CD34<sup>2+</sup> CD38<sup>-</sup> and not more mature CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> human hematopoietic progenitor cells". Journal of Experimental Medicine 180: 1177-1182.
- SODELBERG, S.F., BARNETT, J.B., BAKER, M.L. y SALARI, H. (1990). "Post-irradiation treatment with Cooper(II)2 (3,5-diisopropylsalicylate)<sub>4</sub> enhances radiation recovery and hemopoietic regeneration". Experimental Hematology 18: 801-805.
- SOUZA, L.M., BOONE, T.C., GABRILOVE, J., LOI, P.H., ZSEBO, K.M., MURDOCK, D.C., CHAZIN, V.R., BRUSZEWSKI, J., LU, H., CHEN, K.K., BARENDT, J., PLATZER, E., MOORE, M.A.S., MERTELSMANN, R. y WELTE, K. (1986). "Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells". Science 232: 61-65.
- SPANGRUDE, G.J., HEIMFELD, S. y WEISSMAN, I.L. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells". Science 241: 58-62.

- SPANGRUDE, G.J. y JOHNSON, G.R. (1990). "Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells". Proceedings of the National Academy of Science USA 87: 7433-7437.
- SPANGRUDE, G.J. (1992). "Characteristics of the hematopoietic stem cell compartment in adult mice". International Journal of Cell Cloning 10: 277-285.
- SPARKS, F., SILVERSTEIN, M., HUNT, J., HASKELL, C., PILCH, Y. y MORTON, D. (1973). "Complications of BCG immunotherapy in patients with cancer". New England Journal of Medicine 289: 827-830.
- SPOONCER, E., GALLAGHER, J.T., KRIZSA, F. y DEXTER, T.M. (1983). "Regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. IV. glycosaminoglycan synthesis and the stimulation of haemopoiesis by  $\beta$ -D-xylosides". Journal of Cellular Biology 96: 510-514.
- SPOONCER, E., LORD, B.I. y DEXTER, T.M. (1985). "Defective ability to self-renew *in vitro* of highly purified primitive haemopoietic cells". Nature 316: 62-65.
- SPOONCER, E., HEYWORTH, C.M., DUNN, A. y DEXTER, T.M. (1986). "Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors". Differentiation 31: 111-118.
- SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., WAKEFIELD, L.M. y deCROMBRUGGHE, B. (1987). "Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta". Journal of Cellular Biology 105: 1039-1045.
- SPORN, M.B. y ROBERTS, A.B. (1988). "Peptide growth factors are multifunctional". Nature 332: 217-218.
- STEIN, J., BORZILLO, G.V. y RETTENMEIR, C.W. (1990). "Direct stimulation of cells expressing receptors for macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) by a plasma membrane bound precursor of human CSF-1". Blood 76: 1308-1314.
- STRATH, M. y SANDERSON, C.J. (1985). "The production and functional properties of eosinophils from bone marrow cultures". Journal of Cellular Science 74: 207-217.
- SUTHERLAND, H.J., EAVES, C.J., EAVES, A.C., DRAGOWSKA, W. y LANSDORP, P.M. (1989). "Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*". Blood 74: 1563-1570.
- SZILVASSY, S.J., FRASER, C.C., EAVES, C.J., LANSDORP, P.M., EAVES, A.C., HUMPHRIES, R.K. (1989). "Retrovirus-mediated gene transfer to purified hemopoietic stem cells with long-term lympho-myelopoietic repopulating ability". Proceedings of the National Academy of Science USA 86: 8798-8802.
- SZILVASSY, S.J., HUMPHRIES, R.K., LANSDORP, P.M., EAVES, A.C. y EAVES, C.J. (1990). "Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87: 8736-8747.
- TALMADGE, J.E., TRIBBLE, H., PENNINGTON, R. POWERSOX, O., SCHENEIDER, M.A., CASTELLI, P., BLACK, P.L. y ABE, F. (1989). "Protective, restorative, and therapeutic properties of recombinant colony-stimulating factors". Blood 73: 2093-2103.

- TANIGUCHI, T. (1988). "Regulation of cytokine gene expression". Annual Reviews of Immunology 6: 439-464.
- TANIKAWA, S., NAKAO, I., TSUNEOKA, K. y NARA, N. (1989). "Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) and recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF) on acute radiation hematopoietic injury in mice". Experimental Hematology 17: 883-888.
- TANIKAWA, S., NOSE, M., AOKI, Y., TSUNEOKA, K., SHIKITA, M. y NARA, N. (1990). "Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on the hematologic recovery and survival of irradiated mice". Blood 76: 445-449.
- TAKATSU, K., TOMINAGA, A., HARADA, N., MITA, S. MATSUMOTO, M., TAKAHASHI, T., KIKUCHI, Y. y YAMAGUCHI, N. (1988). "T-cell replating factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties". Immunological Reviews 102: 107-135.
- TAVASSOLI, M., AIZAWA, S., MATSUOKA, T. y HARDY, C. (1990). "Molecular basis of the recognition of progenitor cells by bone marrow stroma". En: *Hematopoiesis*. Clark, S.C. y Golde, D.W. (Eds.). Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 145-155.
- TEJERO, C., TESTA, N.G. y LORD, B.I. (1984). "The cellular specificity of haemopoietic stem cell proliferation regulators". British Journal of Cancer 50: 335-341.
- TESTA, N.G., HENDRY, J.H. y LAJTHA, L.G. (1974). "The response of mouse haemopoietic colony forming units to repeated whole body X-irradiation". Biomedicine 21: 431-434.
- TESTA, N.G. y DEXTER, T.M. (1977). "Long-term production of erythroid precursor cells (BFU) in bone marrow cultures". Differentiation 9: 193-195.
- TESTA, N.G. y DEXTER, T.M. (1989). "Haemopoietic growth factors: their role in cell development and their clinical use". Cytotechnology 2: 259-267.
- THAMES, H.D. y HENDRY, J.H. (1987). "*Fractionation in radiotherapy*". Taylor y Francis, London, New York, Philadelphia.
- THOMPSON-SNIPES, L., DHAR, V., BOND, M.W., MOSMANN, T.R., MOORE, K.W. y RENNICK, D.M. (1991). "Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors". Journal of Experimental Medicine 173: 507-510.
- THORENS, B., MERMOD, J.J. y VASSALLI, P. (1987). "Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through post-transcriptional regulation". Cell 48: 671-679.
- TILL, J.E. y McCULLOCH, E.A. (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells". Radiation Research 14: 213-222.
- TILL, J.E. y MC CULLOCH, E.A. (1963). "Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo". Radiation Research 18: 96-105.
- TILL, J.E. y McCULLOCH, E.A. (1964). "A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells". Proceedings of the National Academy of Science USA 51: 29-36.

- TILL, J.E. y McCULLOCH, E.A. (1980). "Hemopoietic stem cell differentiation". Biochemical Biophysical Acta 605: 431-459.
- TOKSOZ, D., ZSEBO, K.M., SMITH, K.A., HU, S., BRANKOW, D., SUGGS, S.V., MARTIN, F.H. y WILLIAMS, D.A. (1992). "Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor". Proceedings of the National Academy of Science USA 89: 7350-7354.
- TRENTIN, J.J. (1970). "Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation". En: *Regulation of hematopoiesis*, Vol. 1. Gordon, A.S. (Eds.). Appleton-Century-Crofts, New York. pp. 161-186.
- TRENTIN, J.J. (1989). "Haemopoietic microenvironments". En: *Handbook of the hemopoietic microenvironment*. Tavassoli, M. (Eds.). Humana Press, Clifton, New Jersey. pp. 1-86.
- TSUCHIYA, M., ASANO, S., KAZIRO, Y. y NAGATA, S. (1986). "Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony-stimulating factor". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83: 7633-7637.
- TSUJI, K., NAKAHATA, T., TAKAGI, M., KOBAYASHI, T., ISHIGURO, A., KIKUCHI, T., NAGANUMA, K., KOIKE, X., MIYAJIMA, A., ARAI, K-I. y AKABANE, T. (1990). "Effects of IL-3 and IL-4 on the development of 'connective tissue-type' mast cells: IL-3 supports their survival and IL-4 triggers and supports their proliferation synergistically with IL-3". Blood 75: 421-427.
- TUSHINSKI, R.J., OLIVER, I.T., GUILBERT, L.J., TYNAN, P.W., WARNER, J.R. y STANLEY, E.R. (1982). "Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy". Cell 28: 71-81.
- TUSHINSKI, R.J., LARSEN, A., PARK, L.S., SPOOR, E., WILLIAMS, D.E. y MOCHIZUKI, D.Y. (1991). "Interleukin 4 alone or in combination with interleukin 1 stimulates 3T3 fibroblasts to produce colony-stimulating factors". Experimental Hematology 19: 238-244.
- UCKUN, F.M., GILLIS, S., SOUZA, L. y SONG, W. (1989). "Effects of recombinant growth factors on radiation survival of human bone marrow progenitors cells". International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 16: 415-435.
- UCKUN, F.M., SOUZA, L., WADDICK, K.G., WICK, M. y SONG, C.W. (1990). "In vivo radioprotective effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor in lethally irradiated mice". Blood 75: 638-645.
- UNSCEAR (1988). United Nations Committee on the effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly. New York. Appendix to Annex G.
- UDUPA, K.B. y LIPSCHITZ, D.A. (1988). "An evaluation of the role of microenvironmental factors in the limitation of myelopoiesis in murine long-term bone marrow culture". Experimental Hematology 16: 112-116.
- VADHAN-RAJ, S., KEATING, M., LE MAISTRE, P., HITTELMANN, W.N., MC CREDIE, K., TRUJILLO, J.M., BROXMEYER, H.E., HENNEY, C. y GUTTERMAN, J.U. (1987). "Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes". New England Journal of Medicine 317: 1545-1552.

- VADHAN-RAJ, S., JEHA, S.S., BUESCHER, S., LE MAISTRE, P., YEE, G., LU, L., LLORETA, J., HOOTS, W.K., HITTELMANN, W.N., GUTTERMANN, J.U. y BROXMEYER, H.E. (1990). "Stimulation of myelopoiesis in patients with congenital neutropenia; biology and nature of response to recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Blood 75: 858-864.
- VAN OS, R., THAMES, H.D., KONINGS, A.W.T. y DOWN, J.D. (1993). "Radiation dose-fractionation and dose-rate relationships for long-term repopulating hemopoietic stem cells in a murine bone marrow transplant model". Radiation Research 136: 118-125.
- VEIBY, O.P., LOVHAUG, D., FJERDINGSTAD, H. y ENGELSEN, S.J. (1992). "Indirect stimulation of hemopoiesis by hemoregulatory peptide (HP-5b) dimer in murine long term bone marrow cultures". Experimental Hematology 20: 192-195.
- VILCEK, J. y LEE, T.H. (1991). "Tumor necrosis factor". Journal of Biological Chemistry 266: 7313-7316.
- VISSER, J.W.M., BAUMAN, J.G.J., MULDER, A.H., ELIASON, J.F. y deLEEuw, A.M. (1984). "Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells". Journal of Experimental Medicine 59: 1576-1590.
- VISSER, J.W.M. y VAN BEKKUM, D.W. (1990). "Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present". Experimental Hematology 18: 248-256.
- VUILLET-GAUGLER, M.H., BRETON-GORIUS, J., VAINCHENKER, W., GUICHARD, J., LEROY, C., TCHERNIA, G. y COULOMBEL, L. (1990). "Loss of attachment of fibronectin with terminal human erythroid differentiation". Blood 75: 865-873.
- WADDICK, K.G., SONG, C.N., SOUZA, L. y UCKUN, F.M. (1991). "Comparative analysis of the in vivo radioprotective effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) recombinant granulocyte-macrophage CSF and their combination". Blood 77: 2364-2371.
- WATT, S.M. y VISSER, J.W.M. (1992). "Recent advances in the growth and isolation of primitive human haemopoietic progenitor cells". Cell Proliferation 25: 263-297.
- WHETTON, A.D. y DEXTER, T.M. (1989). "Myeloid haemopoietic growth factors". Biochimistry Biophysics Acta 989: 111-132.
- WHITLOCK, C.A., TIDMARSH, G.F., MULLER, S.C. y WEISSMAN, I.L. (1987). "Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule". Cell 48: 1009-1021.
- WIGHT, T.N., KINSELLA, M.G., KEATING, A. y SINGER, J.W. (1986). "Proteoglycans in human long-term bone marrow cultures : biochemical and ultrastructural analyses". Blood 67: 1333-1343.
- WILLIAMS, N. y JACKSON, H. (1977). "Analysis of populations of macrophage-granulocyte progenitor cells stimulated by activities in mouse lung conditioned medium". Experimental Hematology 5: 523-534.

- WILLIAMS, N., JACKSON, H. y RABELLINO, E. (1977). "Proliferation and differentiation of normal granulopoietic cells in continuous bone marrow cultures". Journal of Cellular Biology 93: 435-440.
- WILLIAMS, N., JACKSON, H., SHERIDAN, A.P.C., MURPHY, M.J., ELSTE, A. y MOORE, M.A.S. (1978). "Regulation of megakaryocytopoiesis in long-term murine bone marrow culture". Blood 51: 245-255.
- WILLIAMS, D.A., ORKIN, S.H. y MULLIGAN, R.C. (1986). "Retrovirus-mediated transfer of human adenosine deaminase gen sequences into cells in culture and into murine hematopoietic cells *in vivo*". Proceedings of the National Academy of Science USA 83: 2566-2570.
- WILLIAMS, N. (1990). "Stimulators of megakaryocyte development and platelet production". Progress in Growth Factor Research 2: 81-95.
- WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W., URBANOWSKA, E., AUKERMAN, S., POLLARD, J.W., STANLEY, E.R., RALPH, P., ANSARI, A.A., SELL, K.W. y SZPERL, M. (1991). "Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic op/op mouse suggests local, developmental and humoral requirements for this growth factor". Experimental Hematology 19: 1049-1056.
- WIMPERIS, J.Z., NIEMEYER, C.M., SIEFF, C.A., MATHEY-PREVOT, B., NATHAN, D.G. y ARCECI, R.J. (1989). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 mRNAs are produced by a small fraction of blood mononuclear cells". Blood 74: 1525-1530.
- WOLF, N.S. y PRIESTLEY, G.V. (1986). "Kinetics of early an late spleen colony development". Experimental Hematology 14: 676-682.
- WONG, G.G., WITEK, J.S., TEMPLE, P.A., WILKENS, K.M., LEARY, A.C., LUXENBERG, D.P., JONES, S.S., BROWN, E.L., KAY, R.M., ORR, E.C., SHOEMAKER, C., GOLDE, D.W., KAUFMAN, R.J., HEWICK, R.M., WANG, E.A. y CLARK, S.C. (1985) "Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA purification of the natural and recombinant proteins". Science 228: 810-815.
- WONG, G.H.W. y GOEDDEL, D.V. (1988). "Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism". Science 242: 941-944.
- WORTON, R.G., McCULLOCH, E.A. y TILL, J.E. (1969). "Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity of self-renewal". Journal of Experimental Medicine 130: 91-101
- WRIGHT, E.G. y PRAGNELL, I.B. (1992). "The stem cell compartment: assays and negative regulators". En: *Hematopoietic stem cells. Animal models and human transplantation*. Müller-Sieburg, C., Torok-Storb, B., Visser, J. y Storb, R. (Eds.). Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong, Barcelona, Budapest. pp. 137-150.
- WU, A.M., TILL, J.E., SIMINOVITCH, L. y McCULLOCH, E.A. (1967). "A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells". Journal of Cellular Physiology 69: 177-184.
- WU, S.G., TUBOI, A. y MIYAMOTO, T. (1989). "Radioprotection of C3H mice by recombinant human interleukin-1 $\alpha$ ". International Journal of Radiation Biology 56: 485-492.



- WUEST, B. y WACHSMUTH, E.D. (1982). "Stimulatory effect of N-acetyl muramyl dipeptide *in vivo*: proliferation of bone marrow progenitor cells in mice". Infection and Immunity 37: 452-462.
- YANG, Y.C. (1992). "Interleukin-9". Leukemia and Lymphoma 8: 441-453.
- YOSHIDA, H., HAYASHI, S-I, KUNISADA, T., OGAWA, M., NISHIKAWA, S., OKAMURA, H., SUDO, T., SCHULTZ, L.D. y NISHIKAWA, S-I. (1990). "The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating gene". Nature 345: 442-446.
- YOKOTA, T., LEE, F., RENNICK, D., HALL, C., ARAI, N., MOSMANN, T., NABEL, G., CANTOR, H. y ARAI, K.I. (1984). "Isolation and characterization of a mouse cDNA clone that expresses mast-cell growth-factor activity in monkey cells". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1070-1074.
- YOKOTA, T., ARAI, N., DE VRIES, J.E., SPITS, H., BANCHERAU, J., ZLOBNIK, A., RENNICK, D., HOWARD, M., TAKEBE, Y., MIYATAKE, S., LEE, F. y ARAI, K.I. (1988). "Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells". Immunological Reviews 102: 137-187.
- YUHAS, J.M. y STORER, J.B. (1969). "On mouse strain differences in radiation resistance: hematopoietic death and the endogenous colony-forming unit". Radiation Research 39: 608-622.
- ZHOU, Y-Q., LEVESQUE, J-P., HATZFELD, A., CARDOSO, A.A., LI, M-A., SANSILVESTRI, P. y HATZFELD, J. (1993). "Fibrinogen potentiates the effect of interleukin-3 on early human hematopoietic progenitors". Blood 82: 800-806.
- ZIPORI, D., DUKSIN, D., TAMIR, M., ARGAMAN, A., TOLEDO, J. y MALIK, Z. (1985). "Cultured mouse marrow stromal cell lines II. Distinct subtypes differing in morphology, collagen types, myelopoietic factors and leukemic cell growth modulating activities". Journal of Cellular Physiology 122: 81-90.
- ZIPORI, D., KALAI, M. y TAMIR, M. (1988). "Restrictins: stromal cell factors that control organization in hemopoietic tissues". Nat. Immunology and Cell Growth Regulation 7: 185-192.
- ZIPORI, D. (1990). "Regulation of hemopoiesis by cytokines that restrict options for growth and differentiation". Cancer Cells 2: 205-211.
- ZSEBO, K.M., YUSCHENKOFF, V.N., SCHIFFER, S., CHANG, D., McCALL, E., DINARELLO, C.A., BROWN, M.A., ALTROCK, B. y BAGBY, G.C.J. (1988). "Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF". Blood 71: 99-103.
- ZSEBO, K.M., WYPYCH, J., McNIECE, I.K., LU, H.S., SMITH, K.A., KARKASE, S.B., SACHDER, R.K., YUSCHENKOFF, V.N., BIRKETT, N.C., WILLIAMS, L.R., SATYAGAL, V.N., TUNG, W., BOSSELMAN, R.A., MENDIAZ, E.A. y LANGLEY, K.E. (1990). "Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from Buffalo rat liver-conditioned medium". Cell 63: 195-201.

- ZSEBO, K.M., SMITH, K.A., HARTLEY, C.A., GREENBLATT, M., COOKE, K., RICH, W. y McNIECE, I.K. (1992). "Radioprotection of mice by recombinant rat stem cell factor". Proceedings of the National Academy of Science USA 89: 9464-9468.
- ZUCALI, J.R., DINARELLO, C.A., OBLON, D.J., GROSS, M.A., ANDERSON, L. y WEINER, R.S. (1986). "Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E<sub>2</sub>". Journal of Clinical Investigation 77: 1857-1863.
- ZUCALI, J.R., MOREB, J., GIBBONS, W., ALDERMAN, J., SURESH, A., ZHANG, Y. y SHELBY, Z.B. (1994). "Radioprotection of hematopoietic cells by interleukin-1". Experimental Hematology 22: 130-135.
- ZUCKERMANN, K.S., PRINCE, C.W. y GAY, S. (1989). "The hemopoietic extracellular matrix". En *Handbook of the hemopoietic microenvironment*. Tavassoli, M. (Eds.). Humana Press, Clifton, New Jersey. pp. 399-432.